

Roberta de Paula Martins

**PAPEL DA NEOPTERINA SOBRE A ATIVAÇÃO DO
COMPLEXO INFLAMASSOMA NO SISTEMA NERVOSO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
em Bioquímica da Universidade Federal de Santa
Catarina e à *Faculty of Medicine and Health
Sciences, Macquarie University*, para a obtenção
do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadores:

Prof. Dra. Alexandra Susana Latini (UFSC)

Prof. Dr. Gilles Guillemin (*Macquarie University*)

Coorientadores:

Dra. Renata Tiscoski Nesi (UFSC)

Dr. Chai (Edwin) K. Lim (*Macquarie University*)

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Roberta de Paula
Papel da Neopterina sobre a Ativação do Complexo
Inflamassoma no Sistema Nervoso / Roberta de Paula Martins
; orientadora, Alexandra Susana Latini ; coorientadora,
Renata Tiscoski Nesi. - Florianópolis, SC, 2016.
148 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

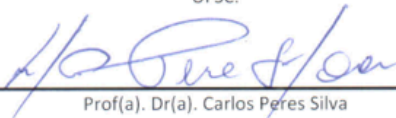
1. Bioquímica. 2. Neopterina. 3. Inflamassoma. 4.
Sistema Nervoso. 5. Transtorno do Espectro Autista. I.
Latini, Alexandra Susana. II. Nesi, Renata Tiscoski. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. IV. Título.

"Papel da neopterinina sobre a ativação do complexo inflamassoma no sistema nervoso"

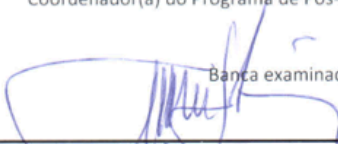
Por

Roberta de Paula Martins

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (006/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica



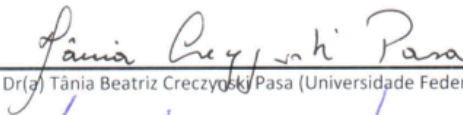
Banca examinadora:
Dr(a) Alexandra Susana Latini (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



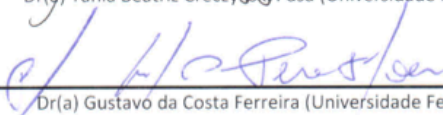
Dr(a) Manuella Pinto Kaster (Universidade Federal de Santa Catarina)



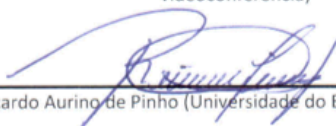
Dr(a) Viviane Glaser (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Tânia Beatriz Creczynski Pasa (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Gustavo da Costa Ferreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro -
videoconferência)



Dr(a) Ricardo Aurino de Pinho (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à minha família, o melhor presente que Deus me deu. Aos meus pais, Roberto e Fátima, pelo amor, exemplo, confiança e incentivo que sempre me ofereceram. Por serem a base de toda a minha vida, e terem me proporcionado as ferramentas para conquistar meus objetivos. Ao meu irmão Leonardo, pelo incentivo e pelo exemplo de dedicação e amor à profissão de professor. À minha cunhada Sonia, pelo carinho e incentivo em todos os momentos. E ao meu sobrinho Eduardo, que mesmo sem saber, torna mais feliz todos os momentos da minha vida, incluindo este.

Ao meu noivo Rodrigo, por estar ao meu lado, amando, acreditando e compartilhando os meus sonhos e dificuldades em todos os momentos, mesmo em continentes diferentes. E à minha futura família Pedro, Zenita, Aline, Alex e Nicolas, pelo incentivo, amor e compreensão.

À minha orientadora, Prof. Alexandra Latini, pela sua confiança no meu trabalho, por seu exemplo e dedicação, e por todas as oportunidades que ela me proporcionou durante essa jornada. E, principalmente, por me fazer acreditar em mim mesma e por sempre exigir o melhor de mim.

À minha co-orientadora, Dr. Renata Nesi, por todo o auxílio científico e principalmente pela amizade e apoio e por tornar todos os momentos mais leves.

Aos professores Aderbal e Anicleto pela contribuição científica e experimental e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Alexandre, Ananda, Anelise, Bruna, Gianni, Jaqueline, Karine, Larissa, Marcos e Priscila pela amizade e apoio, em especial àqueles que ajudaram experimentalmente e na edição desse trabalho. Às amigas Aline, Débora, Karina, Lucila e Vivi, pela colaboração científica e principalmente pela amizade e apoio em todos os momentos dessa caminhada.

Ao meu orientador na *Macquarie University*, Gilles Guillemin, por ter me recebido em seu laboratório, proporcionando-se uma experiência enriquecedora profissional e pessoalmente. Pela sua disponibilidade e apoio científico.

Ao meu co-orientador, Chiat (Edwin) Lim, pela amizade e incentivo, além da contribuição científica e experimental.

Ao professor, Jim Piper, vice-reitor de pesquisa da *Macquarie University*, que viabilizou a minha participação no curso de inglês *University Entry English Preparation Program for Human Sciences*,

Arts and Science nesta mesma universidade.

Aos colegas de laboratório, Ariel, David, Gloria, Josien, Seray and Serene, por terem me recebido de braços abertos. Em especial, Vanessa e Benjamin, pela ajuda indispensável.

Ao professor Marcelo Farina, responsável pelo meu início na carreira científica como meu primeiro orientador.

Aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos repassados.

Aos técnicos Vanessa, Bibiana e Dênis pela ajuda indispensável.

Às minhas amigas do coração, Tamirys, Marcela, Rafa, Tchéli, Flávia, Samara e Joseva.

À todos os amigos e familiares, que me incentivaram, e que direta ou indiretamente participaram desta fase da minha vida... Muito obrigada!!

Ao Sinter, UFSC e Macquarie University por viabilizaram a realização do doutorado em co-tutela.

Ao CNPq, CAPES, programa Ciências sem Fronteiras e à *Macquarie University* pelo apoio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

Lista de publicações relacionadas à Tese:

MARTINS, R.P.; GHISONI, K.; LIM, C. K.; GUILLEMIN, G. J.; LATINI, A. *Neopterin Prevents Inflammasome Activation in Human Primary Astrocytes*. Submetido à *BBA General Subjects*.

GHISONI, K.; **MARTINS, R.P.**; BARBEITO, L.; LATINI, A. *Neopterin as a Potential Cytoprotective Brain Molecule*. *Journal of Psychiatric Research*, v. 71, p. 134-139, 2015.

LIM, C. K. ; ESSA, M. M. ; **MARTINS, R.P.**; LOVEJOY, D. B. ; WALY, M. I. ; AL-FARSI, Y. M. ; AL-SHARBATI, M. ; AL-SHAFFAE, M. A. ; GUILLEMIN, G. J. *Altered Kynurenine Pathway Metabolism in Autism: Implication for Immune-Induced Glutamatergic Activity*. *Autism Research*, In Press.

Outras publicações durante o período de Doutorado:

MARTINS, R.; GLASER, V.; SCHEFFER, D.L.; FERREIRA, P.M.F.; WANNMACHER, C.M.D.; FARINA, M.; OLIVEIRA, P.A.; PREDIGER, R.D.; LATINI, A. *Platelet oxygen consumption as a peripheral blood marker of brain energetics in a mouse model of severe neurotoxicity*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.45, p.449 - 457, 2013.

GLASER, V.; **MARTINS, R.P.**; VIEIRA, A. J.; OLIVEIRA, E.M.; STRALIOTTO, M.R.; MUKDSI, J.; TORRES, A.; BEM, A. F.; FARINA, M.; ROCHA, J.B.T.; DE PAUL, A.; LATINI, A. *Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.390, p.1 - 8, 2014.

SCHEFFER, D.L.; **MARTINS, R.P.**; DE PAUL, A.; TORRES, A.; Guglielmo, L.G.A.; PREDIGER, R.D.; Ward, C.; Andrews, N.; AGUIAR, J.R.; LATINI, A. *Levodopa improves performance fatigability in reserpine- treated mice*. Submetido à *npj Parkinson's Disease*.

AGUIAR, J.R.; TRISTÃO, F.S.M.; AMAR, M.; CHEVARIN, C.; GLASER, V.; **MARTINS, R.P.**; MOREIRA, E.L.G.; MONGEAU, R.;

LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R.; LATINI, A.; PREDIGER, R.D. *Six Weeks of Voluntary Exercise don't Protect C57BL/6 Mice Against Neurotoxicity of MPTP. Neurotoxicity Research*, v. 25, n. 2, p.147-52. 2014.

POLO, L.K.; FELIX, M.R.L.; KREUSCH, M.; PEREIRA, D.T.; COSTA, G.B.; SIMIONI, C.; **MARTINS, R.**; LATINI, A.; FLOH, E.S.I.; CHOW, F.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L.; SCHMIDT, É.C. *Metabolic profile of the brown macroalga Sargassum cymosum (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. Journal of Applied Phycology* v. 27, p. 887-899, 2015.

ALMEIDA, S.L.; SCHMIDT, E.C.; PEREIRA, D.T.; KREUSCH, M.L.; FELIX, M.R.; OSORIO, L.K.P.; **MARTINS, R.P.**; LATINI, A.; RAMLOV, F.; CHOW, F.; MARASCHIN, M.; RODRIGUES, A.C.; BOUZON, Z.L. *Effect of ultraviolet-B radiation in laboratory on morphological and ultrastructural characteristics and physiological parameters of selected cultivar of Oryza sativa L. Protoplasma*, v.250, p.1303 - 1313, 2013.

GOUVEIA, C.; KREUSCH, M.; SCHMIDT, É.C.; FELIX, M.R. DE L.; OSORIO, L.K.P.; PEREIRA, D.T.; DOS SANTOS, R.; OURIQUES, L.C.; **MARTINS, R.**; LATINI, A.; RAMLOV, F.; CARVALHO, T.J.G., CHOW, F., MARASCHIN, M., BOUZON, Z.L. *The Effects of Lead and Copper on the Cellular Architecture and Metabolism of the Red Alga Gracilaria domingensis. Microscopy and Microanalysis (Print)*, v.19, p.513 - 524, 2013.

SCHMIDT, E.C., PEREIRA, B., PONTES, C.L.M., SANTOS, R., SCHERNER, F., HORTA, P.A., **MARTINS, R.P.**, LATINI, A., MARASCHIN, M., BOUZON, Z.L. *Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte Chondracanthus teedei (Rhodophyta, Gigartinales). Protoplasma*, v. 249, p.353 - 367, 2012.

SANTOS, R.W.; SCHMIDT, É.C.; **MARTINS, R.P.**; LATINI, A.; HORTA, P.A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z.L. *Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in the agarophyte Gracilaria domingensis (Rhodophyta, Gracilariales). American Journal*

of Plant Sciences. , v.3, p.1077. 2012.

BOUZON, Z. L.; CHOW, F.; ZITTA, C.S.; DOS SANTOS, R.W.; OURIQUES, L.C.; FELIX, M.R. DE L.; OSORIO, L.K.P.; **MARTINS, R.**; GOUVEIA, C.; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; SCHMIDT, E.C. *Effects of Natural Radiation, Photosynthetically Active Radiation and Artificial Ultraviolet Radiation-B on the Chloroplast Organization and Metabolism of Porphyra acanthophora var. brasiliensis (Rhodophyta, Bangiales). Microscopy and Microanalysis*, v. 18, n. 6, p. 1467-79. 2012.

SCHMIDT, É.C.; SANTOS, R.W.; FAVERI, C.; HORTA, P.A.; **MARTINS, R.P.**; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z.L. *Response of the agarophyte Gelidium floridanum after in vitro exposure to ultraviolet radiation B: changes in ultrastructure, pigments, and antioxidant systems. Journal of Applied Phycology*, p.1 - 15, 2012.

SCHMIDT, É.C.; PEREIRA, B.; DOS SANTOS, R.W.; GOUVEIA, C.; COSTA, G.B.; FARIA, G.S.M.; SCHERNER, F.; HORTA, P.A.; **MARTINS, R.P.**; LATINI, A.; RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z.L. *Responses of the macroalgae Hypnea musciformis after in vitro exposure to UV-B. Aquatic Botany*, v.100, p.8 - 17, 2012.

RESUMO

A inflamação é um processo essencial à proteção do organismo, entretanto, pode tornar-se prejudicial quando persistente. Neste contexto, vários estudos têm sugerido a ativação do inflamassoma, complexo que processa as citocinas pró-inflamatórias pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas maduras, como um evento determinante na patogênese de condições inflamatórias. Evidências têm demonstrado que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) deve induzir a ativação do inflamassoma NLRP3. A neopterina, uma pteridina endógena, é considerada um biomarcador precoce e sensível de ativação do sistema imune. Concentrações elevadas de neopterina podem ser encontradas nos fluidos biológicos de pacientes com doenças neurológicas/neurodegenerativas. Entretanto, as concentrações da neopterina no líquido cefalorraquidiano parecem não corresponder diretamente com as concentrações observadas no plasma, sugerindo que a pteridina tenha uma produção no sistema nervoso central (SNC) de maneira independente da periferia. Apesar de elevadas concentrações de neopterina terem sido associadas a estresse oxidativo e inflamação durante décadas, seu papel nestas condições ainda não está elucidado. Assim, investigou-se a produção de neopterina no SNC e seus efeitos sobre a ativação do inflamassoma em condições inflamatórias. Inicialmente, investigou-se se os astrócitos contribuem para a síntese de neopterina e qual o efeito da neopterina exógena em condições de mitotoxicidade induzida por azida sódica. Observou-se que astrócitos corticais produzem e secretam neopterina para o meio extracelular em condições de mitotoxicidade. Além disso, neopterina (50 nM) inibiu a produção de ERO e aumentou o conteúdo de heme-oxigenase-1 induzido pela mitotoxina. A fim de avaliar a produção central de neopterina, induziu-se a inflamação aguda através da administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg) em camundongos suíços adultos. Foi observado que o LPS aumentou rapidamente a produção de neopterina no hipocampo e a secreção da mesma no soro, fenômenos que aconteceram em paralelo à ativação do inflamassoma. Com o objetivo de melhor compreender as consequências da produção de neopterina no SNC, avaliou-se também o papel do pré-condicionamento com neopterina na ativação do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de células nervosas humanas. Observou-se que o pré-condicionamento com neopterina reduziu a ativação do inflamassoma em astrócitos humanos, além de inibir a expressão gênica de pró-caspase-1 em neurônios. Ainda, a neopterina aumentou a

secreção astrocitária das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1Ra. Considerando que além de biomarcador da ativação do sistema imune, a neopterina deve exercer funções neuroprotetoras em condições inflamatórias no SNC, analisou-se a secreção de neopterina e mediadores inflamatórios no soro de pacientes diagnosticados com Transtorno do Espectro Autista (TEA). Observou-se concentrações elevadas de neopterina e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1Ra em pacientes diagnosticados com TEA, porém as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 não aumentaram significativamente. Em conclusão, a produção de neopterina anterior ou em paralelo à estímulos inflamatórios no SNC pode exercer funções neuroprotetoras, favorecendo a resistência ao estresse oxidativo e inibindo a ativação do inflamassoma, provavelmente devido a ativação da via Nrf2/OH-1.

Palavras-chave: Neopterina, inflamassoma, estresse oxidativo, sistema nervoso central, transtorno do espectro autista

ABSTRACT

Inflammation is an essential process for host defense; however, it can become harmful when sustained. Several studies have suggested that inflammasome activation, a protein complex responsible for the maturation of pro-inflammatory cytokines, pro-IL-1 β and pro-IL-18, is a key event in the pathogenesis of inflammatory diseases. It has been demonstrated that reactive oxygen species (ROS) production may trigger NLRP3 inflammasome activation. Neopterin, an endogenous pteridin, is considered an early and sensitive biomarker of immune system activation. Elevated neopterin levels can be found in the biological fluids of patients affected by neurological/neurodegenerative diseases. The origin of the metabolite in the brain is still not completely defined, but there is some evidence suggesting that neopterin synthesis in the central nervous system (CNS) is independently of the periphery. Although elevated neopterin levels have been associated with oxidative stress and inflammation for decades, the role of the pteridine in these conditions remains also unclear. Initially, it was investigated whether astrocytes could contribute to neopterin synthesis and the effects of exogenous neopterin on azide-induced mitotoxicity. It was observed that rat cortical astrocytes produced and released neopterin under mitochondrial stress. In addition, extracellular neopterin (50 nM) inhibited ROS production and increased heme-oxygenase-1 (HO-1) content. Thus, we investigated neopterin production in the CNS under lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory conditions. A single LPS (0.33 mg/kg; intraperitoneal) injection in adult Swiss mice elicited an early hippocampal and serum increase of neopterin levels, phenomenon that occurred in parallel with inflammasome activation. Aiming to better understand the role of neopterin under inflammatory conditions in the CNS, we evaluated the effect of pre-conditioning human primary nerve cells on LPS-induced inflammasome activation. Neopterin pre-conditioning inhibited the inflammasome activation in astrocytes and neurons. Moreover, neopterin conditioning increased the astrocytic release of anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1Ra. Finally, considering that neopterin showed the above mentioned cytoprotective effects and that it is a clinical biomarker for inflammation, we then analyzed the levels of neopterin and cytokines in the serum of patients affected by Autism Spectrum Disorders (ASD), which pathophysiology is still virtually unknown. Higher neopterin and anti-inflammatory IL-10 and IL-1Ra levels were observed in ASD patients, while IL-1 β , TNF- α and IL-6 did not change. In conclusion,

neopterin may exert neuroprotective functions when produced before or in parallel with the inflammatory stimulus in the CNS by favoring oxidative stress resistance and inhibiting inflammasome activation, probably by activating the Nrf2/HO-1 cytoprotective pathway.

Keywords: Neopterin, inflammasome, oxidative stress, central nervous system, autism spectrum disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI-R: Entrevista para Diagnóstico de Autismo - Revisada
AGMO: Alquilglicerol monooxigenases
AIM2: Ausente em melanoma 2
APC: Aloficociamina
ARE: Elemento de resposta antioxidante
ASC: Proteína semelhante a partícula apoptótica contendo CARD
ASK1: Proteína quinase reguladora de sinais de apoptóticos 1
ATP: Adenosina trifosfato
B2M: Beta-2 microglobulina
BH4: Tetrahidrobiopterina
BHE: Barreira hematoencefálica
BLAST: do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
BSA: Albumina sérica bovina
CAPS: Síndromes periódicas associadas a criopirina
CARD: Domínio efetor de recrutamento de caspases
CARS: Escala de Classificação de Autismo na Infância
CASP: Pró-domínio protease formado por p20 e p10
CDC: Citolisina dependente de colesterol
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
CIITA: Transativador do MHC de classe II
CINCA: Síndrome neurológica cutânea articular crônica infantil
CLRs: Receptores lectina tipo-C
DAMPs: Padrões moleculares associados a perigo
DCF: 2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA: 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato
DMEM: Meio de Eagle com modificação de Dubelcco
EDTA: Ácido etileno diamino tetracético
ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
EPM: Erro padrão da média
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
ERO: Espécies reativas de oxigênio
FCAS: Síndrome auto-inflamatória familiar associada ao frio
FCCP: Carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidroxona
FIIND: Domínio com função a ser descoberta
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GPx: Glutathione peroxidase
GR: Glutathione redutase

GSH: Glutathiona
GTP: Guanosina trifosfato
GTPCH: Guanosina trifosfato ciclohidrolase I
HET-E: Proteína de incompatibilidade de *Podospora anserina*
HIN: Domínio de expressão hematopoiética, induzível por interferon, de localização nuclear
HO-1: Heme-oxigenase-1
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
HREC: Comitê de Ética para Pesquisa em Humanos
i.c.v.: Intracerebroventricular
IDO-1: Indoleamina-2,3-dioxigenase 1
IDO-2: Indoleamina-2,3-dioxigenase 2
IFN: Interferon
IL: Interleucina
IL-1Ra: Antagonista do receptor de IL-1
IκB: Inibidor de proteínas κB
i.p.: Intraperitoneal
IPAF: Fator ativador da atividade da enzima conversora de IL-1
IRAK: Quinase associada ao receptor de IL-1
JAK: Janus quinases
Keap1: do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*
LCR: Líquido cefalorraquidiano
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano
LRR: Repetições ricas em leucina
LTP: Potencial de longa duração
MAMPs: Padrões moleculares associados a microorganismos
MAPK: Proteínas quinase ativadas por mitógeno
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridina
RNAm: RNA mensageiro
MWS: Síndrome de Muckle–Wells
MYD88: Fator 88 de diferenciação mielóide
7,8-NH₂: 7,8-dihidroneopterina
NACHT: NAIP, CIITA, HET-E e TP1
NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídio
NADPH: Fosfato de nicotinamida e adenina dinucleotídeo
NaF: Fluoreto de sódio
NAIP: Proteína inibidora da apoptose neuronal
NALP: Proteína contendo domínios NACHT, LRR e PYD

Na₃VO₄: Ortovanadato de sódio
NF-κB: Fator nuclear kappa B
NLRC4: NLR contendo domínio CARD 4
NLRP: Proteína da família NLR, contendo domínio pirina
NLRs: Receptores do tipo NOD
NOD: Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos
NOMID: Doença auto-inflamatória multissistêmica neonatal
NOS: Óxido nítrico sintase
NOS1: Óxido nítrico sintase neuronal
NOS2: Óxido nítrico sintase induzida
NOS3: Óxido nítrico sintase endotelial
NMDA: N-metil-D-aspartato
Nrf2: Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
ON: Óxido nítrico
P2X₇R: Receptor P2X₇
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
PBS: Tampão fosfato salina
PHA: Fenilalanina hidroxilase;
PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões
PTPS: 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase
PYD: Domínio pirina
RIG: Gene induzível por ácido retinóico
RIPA: Tampão para ensaio de radio imuno-precipitação
RLRs: Receptores do tipo RIG
RNA: Ácido ribonucleico
RPMI: do inglês *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS
SFB: Soro fetal bovino
sIL-1Ra: IL-1Ra solúvel
SNC: Sistema nervoso central
SPSS: do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*
SR: Sepiapterina redutase
STATs: Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TBS: Solução salina tamponada com Tris
TBS-T: Solução salina tamponada com Tris e Tween
TCA: Ácido tricloroacético

TDO: Triptofano dioxigenase
TEA: Transtorno do espectro autista
TGF- β : Fator β de transformação do crescimento
TH: Tirosina hidroxilase
Th1: Células T *helper* 1
TIR: Domínio comum aos receptores *Toll*/IL-1
TIRAP: Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLRs: Receptores do tipo *Toll*
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β : Fator de necrose tumoral beta
TP1: Proteína associada à telomerase
TPH: Triptofano hidroxilase
TXNIP: Proteína de interação com a tiorredoxina
TRIF: Adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN- β
TRX1: Tiorredoxina 1
TRX2: Tiorredoxina 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ativação de resposta imune inata mediada por PAMPs, MAMPs e/ou DAMPs.....	34
Figura 2	Estrutura dos inflamassomas convencionais.....	37
Figura 3	Principais vias de ativação convencional do inflamassoma NLRP3.....	42
Figura 4	ERO induzem à ativação do inflamassoma via TXNIP.....	44
Figura 5	Ativação não convencional do inflamassoma NLRP3.....	45
Figura 6	A ativação do inflamassoma contribui para o processo de piroptose.....	47
Figura 7	Síntese de neopterina a partir da via de síntese <i>de novo</i> de BH4.....	53
Figura 8	Papel do IFN- γ na síntese simultânea de neopterina e quinurenina.....	55
Figura 9	Papel do sistema Keap1-Nrf2-ARE na regulação da resposta antioxidante.....	60
Figura 10	Secreção de neopterina induzida por exposição à azida sódica em cultura primária de astrócitos murinos.....	80
Figura 11	A neopterina modula positivamente o conteúdo de HO-1 e inibe o estresse oxidativo induzido por azida sódica em cultura primária de astrócitos corticais.....	82
Figura 12	O LPS induz a rápida produção periférica de neopterina e IL-1 β	85
Figura 13	Avaliação da concentração de neopterina sérica em camundongos expostos ao LPS.....	86
Figura 14	O LPS induz rapidamente a produção hipocampal de neopterina.....	88
Figura 15	O LPS induz a produção central de IL-1 β com consequente ativação de caspase-1.....	90

Figura 16	Detecção de caspase-1 ativada (p20) no sobrenadante de astrócitos expostos ao LPS.....	93
Figura 17	Efeito do LPS sobre a expressão dos genes que codificam pró-IL-1 β e pró-caspase-1 em cultura primária de astrócitos humanos.....	94
Figura 18	Efeito da neopterina sobre a expressão gênica de pró-IL-1 β e pró-caspase-1 e o conteúdo proteico de pró-caspase-1 e ASC em cultura primária de astrócitos humanos estimulados com LPS.....	95
Figura 19	Efeito da neopterina sobre a secreção de citocinas inflamatórias em cultura primária de astrócitos humanos estimulados com LPS.....	97
Figura 20	Efeito da neopterina sobre a secreção de citocinas anti-inflamatórias em cultura primária de astrócitos humanos estimulados com LPS.....	99
Figura 21	Efeito da neopterina sobre a expressão gênica de pró-caspase-1 em cultura primária de neurônios humanos estimulados com LPS.....	102
Figura 22	Indivíduos diagnosticados com TEA apresentam concentrações elevadas de neopterina.....	104
Figura 23	Indivíduos diagnosticados com TEA apresentam concentrações aumentadas de citocinas anti-inflamatórias.....	106

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Representação esquemática do protocolo experimental <i>in vitro</i>	69
------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Compostos que inibem a ativação do inflamassoma NLRP3 e seus mecanismos de ação.....	50
Tabela 2	Efeitos extracelulares da neopterina em sistemas celulares <i>in vitro</i>	58
Tabela 3	Comparação dos efeitos extracelulares <i>in vitro</i> de neopterina (NEO) e 7,8-dihidroneopterina (7,8-NH ₂) em diferentes sistemas celulares.....	59
Tabela 4	Dados demográficos dos participantes.....	70
Tabela 5	Sequência de <i>primers</i> utilizados para determinar a expressão gênica de proteínas em amostras de camundongos.....	76
Tabela 6	Sequência de <i>primers</i> utilizados para determinar a expressão gênica de proteínas em amostras de cultura primária de células humanas.....	77

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	28
2.	ESTADO DA ARTE.....	31
2.1.	NEUROINFLAMAÇÃO..	31
2.2.	INFLAMASSOMA.....	35
2.2.1.	Ativação convencional do inflamassoma NLRP3.....	38
2.2.2.	Ativação não convencional do inflamassoma NLRP3.....	44
2.2.3.	Morte celular por piroptose.....	46
2.2.4.	Ativação do inflamassoma em doenças.....	46
2.2.5.	Ativação do inflamassoma em doenças do SNC.....	48
2.2.6.	Tratamento de doenças que cursam com ativação do inflamassoma.....	49
2.2.7.	Inibidores do inflamassoma NLRP3.....	49
2.3.	NEOPTERINA: BIOMARCADOR EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS.....	51
2.3.1.	Síntese de neopterina.....	51
2.3.2.	A neopterina é um biomarcador periférico da resposta imune celular.....	53
2.3.3.	Produção de neopterina no SNC.....	55
2.3.4.	Efeitos biológicos da neopterina.....	56
2.4.	TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.....	61
3.	OBJETIVOS.....	64
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	64
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1.	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	66
4.1.1.	Animais.....	66
4.1.2.	Indução de inflamação através da administração i.p. de LPS.....	66
4.2.	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	66
4.2.1.	Cultura primária de astrócitos corticais murinos.....	66
4.2.2.	Manutenção da linhagem celular de astroglioma C6.....	67
4.2.3.	Cultivos primários de células nervosas.....	67

	humanas.....	
4.2.3.1.	<i>Cultura primária de astrócitos.....</i>	68
4.2.3.2.	<i>Cultura primária de neurônios.....</i>	69
4.3.	AMOSTRAS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM TEA.....	69
4.4.	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	71
4.4.1.	Análise de neopterinina por cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio imunoenzimático.....	71
4.4.1.1.	<i>Preparação e análise de amostras do estudo in vivo e in vitro.....</i>	71
4.4.1.2.	<i>Preparação e análise de amostras do estudo em pacientes com TEA.....</i>	71
4.4.2.	Análise das proteínas HO-1, IL-1β, caspase-1 e ASC por Western Blot.....	72
4.4.2.1.	<i>Preparação e análise de amostras do estudo in vivo e em células C6.....</i>	72
4.4.2.2.	<i>Preparação e análise de amostras do estudo em cultura primária de células humanas.....</i>	74
4.4.3.	Mensuração da produção de ERO através da taxa de oxidação da diclorofluoresceína.....	74
4.4.4.	Mensuração da concentração de lactato.....	75
4.4.5.	Determinação de citocinas.....	75
4.4.6.	Determinação de proteínas.....	75
4.5.	PARÂMETROS MOLECULARES.....	75
4.5.1.	Determinação da expressão gênica das proteínas GTPCH, pró-IL-1β e pró-caspase-1 por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real	75
4.5.1.1.	<i>Preparação e análise de amostras do estudo in vivo.....</i>	75
4.5.1.2.	<i>Preparação e análise de amostras do estudo in vitro.....</i>	76
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.1.	CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA SÍNTESE E DOS EFEITOS DA NEOPTERINA EM CONDIÇÕES DE MITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>.....	80
5.1.1.	Avaliação da secreção de neopterinina em condições de mitotoxicidade em cultura primária de astrócitos	80

	de ratos neonatos.....	
5.1.2.	Avaliação do efeito da neopterina sobre parâmetros de estresse oxidativo em condições de mitotoxicidade em cultura primária de astrócitos de ratos neonatos.....	81
5.2.	CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE NEOPTERINA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS	84
5.2.1.	Perfil temporal de síntese de neopterina e da citocina pró-inflamatória IL-1β em camundongos suíços adultos submetidos à inflamação induzida por LPS.....	84
5.3.	CAPÍTULO III: EFEITO DA NEOPTERINA NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS NERVOSAS.....	92
5.3.1.	Avaliação da ativação do inflamassoma induzido por LPS em linhagem astrocitária C6.....	92
5.3.2.	Avaliação temporal da expressão de proteínas constituintes do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de astrócitos humanos.....	93
5.3.3.	Avaliação do efeito da neopterina sobre parâmetros relacionados à ativação do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de astrócitos humanos.....	94
5.3.4.	Avaliação do efeito da neopterina sobre parâmetros relacionados à ativação do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de neurônios humanos.....	102
5.4.	CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NEOPTERINA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO SORO DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM TEA.....	103
6.	CONCLUSÕES.....	110
7.	PERSPECTIVAS.....	111
	REFERÊNCIAS.....	112

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta protetora do organismo que visa eliminar patógenos ou moléculas causadoras de danos celulares e teciduais. A persistência e/ou desequilíbrio dessa resposta pode desencadear um estado de inflamação crônica, acarretando um quadro prejudicial de dano tecidual (para revisão ver Hsieh e Yang, 2013). Deste modo, a neuroinflamação e a resposta imune inata são considerados eventos importantes na patogênese de inúmeras doenças do sistema nervoso central (SNC), como por exemplo de Alzheimer, Parkinson, autismo, entre outras (Vargas et al., 2005, Sriram et al., 2006, Gubandru et al., 2013). Em um quadro de neuroinflamação há o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na patogênese de doenças que envolvem o SNC. Entre elas estão as interleucinas (IL)-1 β e IL-18, as quais são sintetizadas como proteínas precursoras e dependem de um posterior processamento executado pela enzima caspase-1 para tornarem-se maduras e exercerem suas funções (Thornberry et al., 1992). Da mesma forma, a ativação da protease caspase-1 é dependente da clivagem proteolítica realizada por um complexo multiprotéico denominado inflamassoma. Esse complexo é constituído por *i*) uma proteína sensora/receptora de localização citosólica que serve como uma plataforma para a formação do complexo, *ii*) uma proteína adaptadora ASC (proteína semelhante a partícula apoptótica contendo CARD (domínio efetor de recrutamento de caspases)), e *iii*) uma proteína efetora, a caspase-1 (Martinon et al., 2002). A formação do inflamassoma facilita a autoclivagem e ativação da caspase-1, a qual cliva proteoliticamente as citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas maduras, favorecendo respostas pró-inflamatórias e anti-microbianas (Broz et al., 2010, Liu et al., 2012).

Embora a ativação do inflamassoma seja essencial para a defesa contra patógenos, estudos recentes demonstraram que a ativação desse complexo está envolvida na patogênese de diversas doenças com componente inflamatório, incluindo condições crônicas periféricas, como o diabetes do tipo 2, e doenças do SNC, como as neurodegenerativas, doença de Parkinson e de Alzheimer; e do desenvolvimento, como o autismo (Halle et al., 2008, Masters et al., 2010, Siniscalco et al., 2012, Codolo et al., 2013, Heneka et al., 2013). Assim, a pesquisa de potenciais inibidores da ativação do inflamassoma permitirá o desenvolvimento de terapias efetivas para o tratamento de doenças com componente inflamatório crônico na sua fisiopatogenia.

O uso de biomarcadores periféricos auxilia a caracterizar

precocemente, avaliar a progressão ou monitorar o tratamento paliativo em processos sistêmicos e/ou neurológicos (Brodacki et al., 2008, Molero-Luis et al., 2013, Wissmann et al., 2013, Suh et al., 2014). Neste contexto, o aumento na concentração de neopterina tem sido relacionado com o desenvolvimento e progressão de doenças com comprometimento neurológico, como doença de Parkinson e Alzheimer (Hull et al., 2000, Widner et al., 2002, Azumagawa et al., 2003, Frick et al., 2004, Molero-Luis et al., 2013, Parker et al., 2013, Wissmann et al., 2013).

A neopterina é um subproduto da via de síntese *de novo* da tetrahydrobiopterina (BH4), sintetizada em condições de estresse celular induzido por estímulos inflamatórios, incluindo interferon (IFN)- γ , LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), peróxido de hidrogênio, entre outros (Troppmair et al., 1988, Frascini et al., 2003, Ishii et al., 2005). Em humanos, a literatura sugere que macrófagos e monócitos seriam os principais produtores de neopterina (Werner et al., 1990), com o intuito de exacerbar a resposta inflamatória por eles mediada. Desta forma, um aumento nas concentrações de neopterina em fluidos biológicos tem sido considerado como um marcador sensível de ativação do sistema imune. Por exemplo, as concentrações plasmáticas dessa pteridina podem aumentar de 2-3 vezes em indivíduos afetados por infecções virais, doenças autoimunes, doenças de progressão crônica periféricas ou do SNC (Fredrikson et al., 1987, Fuchs et al., 1989a, Parker et al., 2013). Além disso, as concentrações de neopterina podem atingir até 500 nmol/L no líquido cefalorraquidiano (LCR) em doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pela deficiência da enzima 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase (PTPS) (Blau et al., 1996).

As investigações relacionadas com a produção de neopterina têm sido geralmente focadas em células da linhagem mielóide periférica (Frascini et al., 2003). No entanto, recentemente, Kuehne e colaboradores (2013) sugeriram que a neopterina também seria produzida no SNC, baseado *i)* no baixo quociente (1/40) estimado para a passagem de neopterina pela barreira hematoencefálica (BHE) (Hagberg et al., 1993); *ii)* nas concentrações superiores de neopterina encontradas no LCR em relação ao plasma ou soro em, por exemplo, pacientes com doenças neurológicas com BHE intacta (Kuehne et al., 2013). Além disso, resultados prévios do nosso grupo estão de acordo com essa proposta de produção central de neopterina, visto que foi observada a secreção do composto por fatias hipocâmpais em condições de toxicidade mitocondrial (Ghisoni e Latini, 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre as funções extracelulares da neopterina no SNC. Alguns estudos associam elevadas concentrações de neopterina (superiores as

encontradas em condições patológicas) com estresse oxidativo, inflamação e apoptose (Weiss et al., 1993, Hoffmann et al., 1996, Schobersberger et al., 1996, Cirillo et al., 2006). Por outro lado, estudos recentes demonstraram que, quando administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.), a neopterina (em concentrações ligeiramente acima das encontradas em condições basais) melhora o estado antioxidante no córtex cerebral de camundongos e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Ghisoni e Latini, 2015). Além disso, facilita a aquisição da memória do tipo aversiva e a geração do potencial de longa duração (LTP) hipocampal e reduz a concentração de IL-6 induzida pela administração periférica de LPS em tecido cerebral de camundongos (Ghisoni et al., 2016).

Considerando-se que a ativação do inflamassoma e a produção e acúmulo de neopterina ocorrem em condições inflamatórias e que a neopterina deve ser produzida e acumulada no tecido nervoso, buscou-se investigar o papel da neopterina na ativação do inflamassoma no SNC.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. NEUROINFLAMAÇÃO

A manutenção da homeostasia do SNC é essencial para o funcionamento das células neuronais. O processo inflamatório desempenha um papel crucial nesse processo de homeostase, principalmente através da defesa ativa contra diversos estímulos nocivos como infecções virais neurotrópicas e/ou danos traumáticos, promovendo o reestabelecimento da função celular e tecidual (Butovsky et al., 2006, Das et al., 2014). O SNC desempenha estratégias para limitar a entrada de elementos imunes bem como a ativação imune tecidual, fenômeno chamado de privilégio imune. Tal condição é parcialmente dependente da presença e da integridade da BHE, a qual limita a entrada de solutos e íons (Carson et al., 2006). Enquanto o acesso imune periférico para o SNC é restrito e finamente controlado, esse é capaz de gerar, de forma aguda ou crônica, respostas inflamatórias e imunes a vários estímulos nocivos, como por exemplo, infecções, trauma, derrame, toxinas e outros (Xiong et al., 2009, Fu et al., 2014, Wang et al., 2014). A resposta neuroinflamatória aguda no SNC inclui a ativação de células imunes residentes, como a microglia, resultando em um fenótipo fagocítico com liberação de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (Henry et al., 2009, Puntener et al., 2012). Enquanto um estímulo agudo pode induzir estresse celular, esse é tipicamente de curta duração e se resolvido, não prejudica a sobrevivência neuronal. Assim, acredita-se que uma resposta neuroinflamatória aguda seja, de maneira geral, benéfica ao SNC, desde que ela tenda a minimizar o dano e contribuir para o reparo do tecido danificado.

Quando a homeostasia do tecido nervoso não é restaurada após a resposta inflamatória aguda local, a neuroinflamação torna-se uma condição crônica, a qual pode levar a morte neuronal, representado um dos vários eventos patológicos induzidos por fatores pró-inflamatórios (para revisão ver Hsieh e Yang, 2013). Além de ativação persistente da microglia e subsequente liberação de mediadores inflamatórios, a neuroinflamação crônica também envolve o aumento do estresse oxidativo e/ou nitrosativo (Tronel et al., 2013, Vasconcelos et al., 2015). A liberação constante de mediadores inflamatórios propaga o ciclo inflamatório, ativando mais células microgliais, promovendo sua proliferação e resultando na liberação de mais fatores inflamatórios. Devido a natureza crônica e persistente da inflamação, pode ocorrer comprometimento da integridade da BHE, aumentando a

permeabilidade da mesma com consequente infiltração de macrófagos periféricos no parênquima cerebral (Yang et al., 2014, Maggioli et al., 2015). A partir desses pressupostos entende-se que a neuroinflamação tem consequências benéficas e deletérias, dependendo, criticamente, da resolução da resposta inflamatória.

As células microgлияis são macrófagos residentes no tecido nervoso e são as primeiras células a responderem a um estímulo nocivo. Desempenham papel crítico no reparo tecidual, regeneração neuronal, regulação do número de sinapses durante o desenvolvimento (Wakselman et al., 2008) e a remoção de neurônios apoptóticos (Takahashi et al., 2005). A microglia pode ser ativada por estímulos agudos ou em estados crônicos como no envelhecimento e em doenças do SNC (McGeer et al., 1988). No seu estado ativado, a microglia divide funções com macrófagos de outros tecidos, destruindo e fagocitando vírus, bactérias e outros invasores; possivelmente apresentando os antígenos para linfócitos infiltrados no tecido cerebral e removendo debris celulares como parte da restauração tecidual. A microglia pode modular a neuroinflamação, recuperar a homeostasia e proteger o tecido nervoso através da produção de citocinas anti-inflamatórias e fatores de reparo tecidual, como glicocorticóides e IFN do tipo 1 α e 1 β (Park et al., 2007, Khorooshi e Owens, 2010). Entretanto, quando a neuroinflamação torna-se crônica e/ou sob estimulação secundária, a microglia produz quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-1 β e IL-6, e ERO (Godbout et al., 2005), exercendo efeitos deletérios e contribuindo para o desenvolvimento de doenças como a de Parkinson (Lazzarini et al., 2013).

Os astrócitos também mantêm a homeostasia normal do tecido cerebral e exercem funções que auxiliam no desenvolvimento e migração de neurônios durante o desenvolvimento do SNC, produção de fatores de crescimento, manutenção da integridade da BHE e participação de respostas imune e de reparo (para revisão ver Pekny e Pekna, 2014)). Nas últimas décadas, funções adicionais dos astrócitos têm emergido, incluindo seu papel crítico no funcionamento sináptico. Especificamente, processos astrocíticos envolvem a maioria das sinapses no cérebro, e expressam receptores para vários neurotransmissores, os quais medeiam elevações na concentração de Ca²⁺ astrocitária, resultando na secreção regulada de gliotransmissores. Os gliotransmissores, por sua vez, modulam a excitabilidade neuronal e força sináptica (Perea e Araque, 2007). Assim como a microglia, os astrócitos apresentam inúmeros receptores envolvidos na imunidade inata, incluindo os receptores do tipo *Toll* (TLRs), principalmente TLR

2 e 4 (Bowman et al., 2003) e do tipo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD) (Sterka et al., 2006). Apesar de não serem consideradas células imunes, os astrócitos também possuem propriedades do tipo imune, como a expressão de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IFN- α e IFN- β , TNF- α e TNF- β), quimiocinas (Choi et al., 2014) e fagocitose de debris celulares (Bechmann e Nitsch, 1997).

As células com papel na resposta imune são ativadas pelo reconhecimento de estímulos nocivos ao tecido, os quais podem ser de origem patogênica ou do próprio hospedeiro. Os estímulos patogênicos são estruturas microbianas conservadas, como LPS, lipoproteínas, flagelina, peptidoglicano ou ácidos nucleicos bacteriano e viral. Essas estruturas são classificadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a microorganismos (MAMPs) (Poltorak et al., 1998, Ozinsky et al., 2000, Souza et al., 2004). Quando invadem tecidos e/ou o sistema circulatório, os PAMPs/MAMPs podem iniciar uma resposta inflamatória mediada pelas células da imunidade inata (Figura 1), com consequente liberação de DAMPs (padrões moleculares associados a perigo). DAMPs são estímulos endógenos que podem ser células danificadas (debris) ou moléculas liberadas durante a morte celular como o ATP (adenosina trifosfato), que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a danos ou ao estresse (Perregaux e Gabel, 1994). DAMPs podem agir sinergicamente com PAMPs/MAMPs e contribuir para o dano tecidual. Quando a resposta inflamatória é desencadeada exclusivamente pela presença de DAMPs, ela é denominada inflamação estéril, por não haver envolvimento de microorganismos (Codolo et al., 2013, Heneka et al., 2013).

A indução da resposta pró-inflamatória mediada por PAMPs, MAMPs ou DAMPs envolve a presença de sensores moleculares, coletivamente chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Existem várias subfamílias de PRRs incluindo os TLRs, do tipo NOD (NLRs), de lectina tipo-C (CLRs) e receptores do tipo RIG (gene induzível por ácido retinóico) (RLRs). No entanto, NLRs têm chamado mais atenção devido à habilidade de formar complexos multiproteicos denominados de inflamassomas. A ativação do inflamassoma já tem sido relacionada à fisiopatologia de diversas doenças crônicas com componente inflamatório, como por exemplo, as doenças neurodegenerativas (Chin et al., 2008, Heneka et al., 2013, Terrill-Usery et al., 2014, Wang et al., 2014).

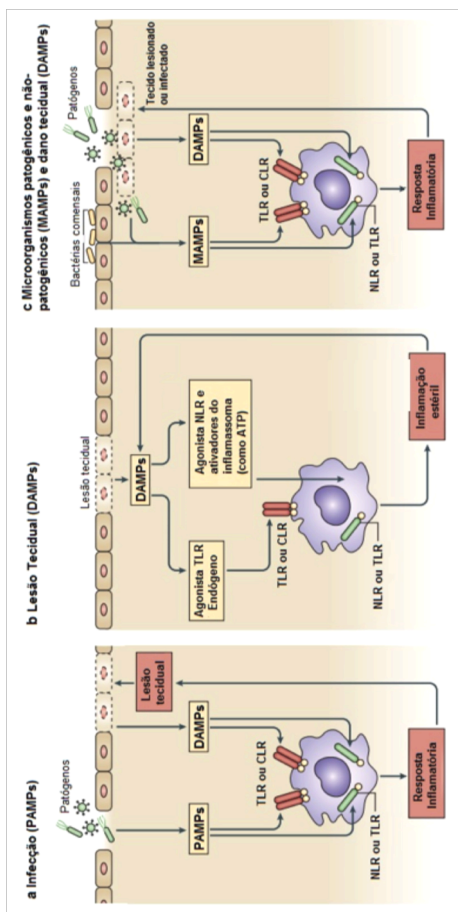


Figura 1. Ativação de resposta imune inata mediada por PAMPs, MAMPs e/ou DAMPs. **(a)** PAMPs liberados de patógenos durante uma infecção e/ou **(c)** MAMPs provenientes de bactérias comensais ativam PRRs localizados na membrana celular, como TLR e CLR, ou no citosol das células imunes, como NLR e alguns subtipos de TLR, levando à resposta inflamatória. Ainda, o processo infeccioso pode levar a lesão tecidual e consequente liberação de DAMPs, os quais também podem ativar os PRRs, contribuindo para a inflamação. **(b)** No caso de lesão tecidual, os DAMPs liberados (por exemplo, ATP) podem ser agonistas endógenos dos receptores TLR e/ou NLR e ativadores do inflamassoma, ou ainda ativar diretamente PRRs de membrana e citosólicos e levar a uma inflamação estéril, desde que não há envolvimento de microorganismos. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; MAMPs: padrões moleculares associados a microorganismos; DAMPs: padrões

moleculares associados a perigo; PRRs: receptores de reconhecimento de padrões; TLR: receptores do tipo *Toll*; CLR: receptores de lectina tipo-C; NLR: receptores do tipo NOD, RLR: receptores do tipo RIG. Adaptado de Mills, 2011.

2.2. INFLAMASSOMA

O inflamassoma consiste em um complexo de proteínas sinalizadoras que promove o processamento de pró-IL-1 β e pró-IL-18 (Martinon et al., 2002), citocinas conhecidas pela habilidade em causar efeitos biológicos associados a infecção, inflamação e processos autoimunes (Bohn et al., 1998, Casamenti et al., 1999, Lachmann et al., 2009b, Palotai et al., 2014). O processamento dos precursores de IL-1 β e IL-18 é mediado pela caspase-1 (Thornberry et al., 1992), protease sintetizada como um zimogênio inativo de 45kDa constituído por um domínio CARD e duas subunidades, p20 (20 kDa) e p10 (10 kDa), que juntas formam o pró-domínio protease. O inflamassoma funciona como uma plataforma que permite a aproximação de duas ou mais pró-caspases, permitindo sua auto-clivagem proteolítica e a formação de um heterodímero enzimaticamente ativo, composto pelas subunidades p20 e p10 (Salvesen e Dixit, 1999, Martinon et al., 2002, Boatright et al., 2003).

Existem quatro inflamassomas convencionais ou canônicos que processam pró-IL-1 β e pró-IL-18 via caspase-1 (Figura 2) e estes são: NLRP1 (proteína da família NLR, contendo domínio pirina 1), NLRP3, IPAF (fator ativador da atividade da enzima conversora de IL-1) e a proteína AIM2 (ausente em melanoma 2) induzida por IFN e pertencente a família HIN (domínio de expressão hematopoiética, induzível por interferon, de localização nuclear). Estes inflamassomas diferem principalmente quanto à estrutura, requerimento da proteína acessória ASC e potenciais ativadores. A proteína ASC é constituída por um domínio pirina (PYD) e um domínio CARD e funciona como um adaptador para a interação entre proteínas contendo PYD e proteínas contendo CARD, como a pró-caspase-1 (Masumoto et al., 1999, Conway et al., 2000).

O AIM2 é formado por um domínio HIN e um domínio PYD, o qual medeia a associação do receptor com a proteína adaptadora ASC, permitindo o recrutamento de pró-caspase-1 e a formação do inflamassoma (DeYoung et al., 1997). Este receptor pode ser ativado tanto por ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano como viral (Hornung et al., 2009, Roberts et al., 2009).

Os receptores NLRP1, NLRP3 e IPAF pertencem à família NLR e são caracterizados pela marcante homologia estrutural com proteínas de resistência à infecções em plantas (Dixon et al., 2000). São constituídos por três domínios: *i*) LRR (repetições ricas em leucina) cuja função está relacionada ao reconhecimento de PAMPs (Kajava, 1998); *ii*) NACHT [NAIP (proteína inibidora da apoptose neuronal), CIITA (transativador do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II), HET-E (proteína de incompatibilidade de *Podospora anserina*) e TP1 (proteína associada à telomerase)] responsável pela oligomerização do receptor (Pop et al., 2006, Faustin et al., 2007); *iii*) e CARD ou PYD, que permitirão a associação com ASC ou pró-caspase-1 (Zou et al., 1997, Bertin et al., 1999, Inohara et al., 1999) (Figura 2).

O IPAF, também conhecido como NLRC4 (NLR contendo domínio CARD 4), contém um domínio CARD, podendo associar-se direta e especificamente com a pró-caspase-1 através de interação homotípica CARD-CARD (Poyet et al., 2001). Pode ser ativado por bactérias inteiras como *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Legionella pneumophila*, bem como por componentes bacterianos como a flagelina (Franchi et al., 2006, Miao et al., 2008, Case et al., 2009). Entretanto, o exato mecanismo da detecção de compostos bacterianos por IPAF e a ativação de caspase-1 ainda não estão totalmente elucidados.

A maior subfamília de receptores NLR é denominada NLRP, também conhecido como NALP (proteína contendo domínios NACHT, LRR e PYD), contendo 14 membros em humanos e 12 em camundongos. Os membros clássicos são NLRP1 e NLRP3 (Martinon et al., 2002, Mariathasan et al., 2004), apesar de NLRP2 também formar inflamassomas funcionais (Minkiewicz et al., 2013). NLRP1 contém os domínios citados anteriormente e, ainda, o domínio FIIND (com função a ser descoberta) seguido por um CARD. Portanto, NLRP1 pode recrutar diretamente a pró-caspase-1. Já foi demonstrado que NLRP1 pode ser ativado por *Bacillus anthracis* e muramil dipeptídeo, constituinte da parede celular bacteriana (Hsu et al., 2008). O receptor NLRP2 não tem sido muito investigado, mas estudos mostraram que esse receptor pode ser ativado por LPS, IFN- α e IFN- γ (Bruey et al., 2004). O NLRP3 é o inflamassoma mais estudado e melhor caracterizado, provavelmente pela capacidade de detectar tanto PAMPs como DAMPs. Quando ativado, o receptor é desubiquitinado (para evitar a degradação por autofagia) e se auto-oligomeriza de maneira dependente de ATP (Duncan et al., 2007). Os complexos NLRP3 e NLRP2, diferentemente de NLRP1, não contém o domínio CARD,

requerendo a proteína adaptadora ASC para o recrutamento de pró-caspase-1. Assim, esses inflamassomas são formados pelas interações homotípicas PYD-PYD entre o receptor e ASC e CARD-CARD entre ASC e pró-caspase-1. O recrutamento de pró-caspase-1 para o complexo proteico levará a sua auto-clivagem e ativação (Figura 2) (Agostini et al., 2004, Bruey et al., 2004).

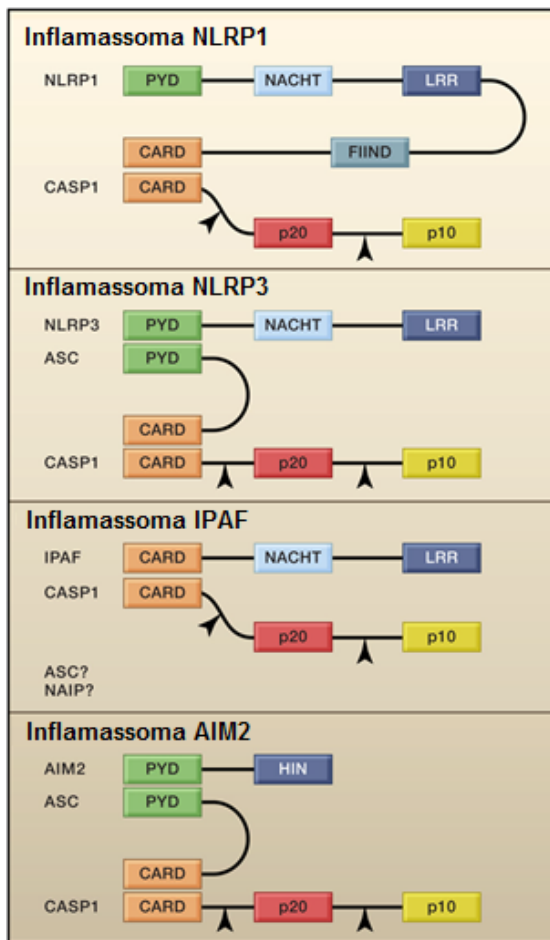


Figura 2. Estrutura dos inflamassomas convencionais. Todos os inflamassomas convencionais são constituídos por um receptor e a proteína efetora pró-caspase-1, diferenciando-se quanto a necessidade da proteína adaptadora ASC. Os receptores NLRP1 e IPAF possuem um domínio CARD, permitindo o

recrutamento de caspase-1 diretamente, enquanto NLRP3 e AIM2 possuem um domínio PYD e necessitam de ASC para formação do inflamassoma. As setas indicam locais de clivagem. LRR: repetições ricas em leucina; NACHT: NAIP, CIITA, HET-E, e TP1; PYD: domínio pirina; CARD: domínio efetor de recrutamento de caspases; FIIND: domínio com função a ser descoberta; HIN: domínio de expressão hematopoietica, induzível por interferon, de localização nuclear. Adaptado de Schroder e Tschopp, 2010.

Os componentes do inflamassoma são comumente expressos em condições fisiológicas em células da linhagem mielóide e/ou tecidos ricos em células envolvidas com a imunidade inata (Kummer et al., 2007, Guarda et al., 2011). No entanto, já foi demonstrado que células nervosas também expressam constitutivamente as proteínas que formam os inflamassomas. Assim, NLRP1 já foi detectado em cultura de neurônios humanos (Kaushal et al., 2015) e em neurônios da medula espinhal de camundongos (de Rivero Vaccari et al., 2008). AIM2 e IPAF também foram detectados em cultura de neurônios humanos, mas não tão expressivamente como NLRP1 (Kaushal et al., 2015). A proteína NLRP2 foi descrita em cultura primária de astrócitos humanos (Minkiewicz et al., 2013), e a presença de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) para IPAF, NLRP1, AIM2 e NLRP3, sendo o último o mais abundante, foi descrita em astrócitos corticais obtidos de camundongos (Alfonso-Loeches et al., 2014). Assim, embora não se conheça detalhadamente a ativação do inflamassoma no SNC, conta-se com evidências sobre a presença de inúmeras proteínas envolvidas no processo.

2.2.1. Ativação convencional do inflamassoma NLRP3

O inflamassoma NLRP3 é considerado único entre os sensores do sistema imune inato visto que pode ser ativado por PAMPs e DAMPs com grande variabilidade estrutural (Mariathasan et al., 2004). O NLRP3 pode ser ativado por altas concentrações de ATP, glicose, ERO, esfingosina, ceramidas, LDL (lipoproteína de baixa densidade) oxidada, peptídeo β -amilóide, cristais de ácido úrico e colesterol, além de irritantes ambientais e produtos químicos tóxicos, como partículas de asbesto, biomateriais, nanopartículas, entre outros (Figura 3) (Halle et al., 2008, Duewell et al., 2010, Jiang et al., 2012, Luheshi et al., 2012). Devido à grande diversidade química e estrutural de seus ativadores (Petrilli et al., 2007, Dostert et al., 2008, Halle et al., 2008), é provável que tanto os agonistas de NLRP3, quanto as vias de sinalização por ele

ativadas, alterem a homeostase celular ou a função de alguma organela que integra os sinais de ativação e, consequentemente, provoque a ativação do inflamassoma. É importante salientar que inflamassomas apenas podem induzir o processamento e secreção de IL-1 β e IL-18 que estão previamente estocadas nas células. Assim, o inflamassoma NLRP3 necessita de dois sinais para ser ativado. O primeiro sinal ou *priming* é fornecido por ligantes de TLR ou bem por ativadores de fator nuclear kappa B (NF- κ B), o qual induzirá a expressão de pró-IL-1 β e também de NLRP3. O segundo sinal ativará diretamente NLRP3, estimulará a ativação de caspase-1 e a clivagem de pró-IL-1 β e pró-IL-18 com subsequente liberação das citocinas maduras.

Existem três principais modelos de ativação do inflamassoma NLRP3 (Figura 3): o efluxo de K⁺ induzido por ATP, a ruptura lisossomal e a produção de ERO.

Podem ser citados entre os ativadores do inflamassoma NLRP3 agentes que induzem o efluxo de K⁺ intracelular, como altas concentrações extracelulares de ATP e/ou toxinas formadoras de poro, como nigericina. Inicialmente demonstrou-se que esses compostos, ATP e nigericina, induzem a secreção de IL-1 β madura via depleção de K⁺ em macrófagos pré-estimulados com LPS (Hogquist et al., 1991, Perregaux e Gabel, 1994). Além disso, Walev e colaboradores (1995) mostraram que a adição de K⁺ ao meio extracelular, bloqueando o efluxo do íon, inibe a secreção de IL-1 β ativa em cultura de monócitos.

A estimulação *in vitro* de macrófagos murinos com altas concentrações de ATP (a partir de 100 μ M) ativa o receptor purinérgico P2X₇ (P2X₇R) que se encontra associado a um canal de cátions e que induz o rápido efluxo de K⁺ (Surprenant et al., 1996). Isso leva a abertura de um grande poro permeável à moléculas de 900 Da ou maiores constituído por panexina-1, proteína da família das conexinas presentes nas junções comunicantes (Pelegrin e Surprenant, 2006). Existem especulações de que ativadores de NLRP3 poderiam atravessar tal poro e ativar o receptor presente no citosol, porém, o papel de panexina-1 na ativação do inflamassoma ainda não está esclarecido.

No que se refere à ativação de P2X₇R, esta acontece exclusivamente na ativação de NLRP3 induzida por ATP. Em macrófagos murinos, a ativação de P2X₇R por ATP exógeno é estritamente necessária para o processamento e secreção de IL-1 β em resposta a estímulos exógenos (Franchi et al., 2007). Entretanto, dependendo do tipo celular e espécie, o primeiro sinal ou *priming* induz alterações celulares (como secreção de ATP) suficientes para ativar NLRP3. Por exemplo em monócitos humanos estimulados com LPS, a

secreção de IL-1 β via NLRP3 foi dependente da ativação de P2X₇R (Piccini et al., 2008). A ativação do inflamassoma NLRP3 via efluxo de K⁺ também já foi induzida por outros ativadores além de ATP, como cristais de urato monossódico, peptidoglicanos da parede celular bacteriana (Petrilli et al., 2007), asbesto (Dostert et al., 2008), entre outros.

O segundo modelo de ativação convencional do inflamassoma foi proposto especialmente para ativadores particulados e/ou cristalinos. Quando endocitados, esses compostos causariam a desestabilização do compartimento ácido lisossomal, com posterior liberação de cathepsina B que ativaria o receptor NLRP3 (Hornung et al., 2008). Neste sentido, foi demonstrado que inibidores de cathepsina B podem prevenir a ativação de caspase-1 induzida por certos microorganismos, como *Neisseria gonorrhoeae* e toxinas bacterianas, como citolisina dependente de colesterol (CDC), em monócitos humanos e macrófagos murinos, respectivamente (Chu et al., 2009, Duncan et al., 2009). Ademais, a desestabilização dos lisossomos pode acarretar na liberação de seu conteúdo de Ca²⁺, com consequente ativação da liberação desse íon pelo retículo endoplasmático e subsequente ativação de NLRP3 (Murakami et al., 2012). O papel da sinalização e fluxo de Ca²⁺ na ativação do inflamassoma ainda não está totalmente elucidado, visto que ainda não há um consenso na literatura sobre o assunto.

No terceiro modelo, a produção de ERO é considerada um evento crítico para a ativação do inflamassoma. Inicialmente, sugeriu-se que a ativação do inflamassoma era induzida por ERO produzida por NADPH (fosfato de nicotinamida e adenina dinucleotídeo) oxidases em macrófagos (Dostert et al., 2008). Porém, como a deficiência em quatro das sete isoformas da enzima não afetou a ativação do inflamassoma em macrófagos humanos (Meissner et al., 2010), os estudos foram direcionados para o envolvimento de ERO de origem mitocondrial (Nakahira et al., 2011, Alfonso-Loeches et al., 2014).

Em condições fisiológicas, a mitocôndria é a principal fonte de ERO durante a transferência de elétrons para a redução completa de oxigênio em água (Barja, 1998). Entretanto, alterações na atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial podem levar à ativação do inflamassoma por produção excessiva das EROs. Por exemplo, o inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, rotenona, induz a produção de ERO mitocondrial conjuntamente com o *priming* do inflamassoma NLRP3, em macrófagos murinos nocautes para as proteínas NLRP3 e Myd88/Trif (fator 88 de diferenciação mielóide/adaptador contendo domínio comum aos receptores *Toll*/IL-1 (TIR)

indutor de IFN- β) (envolvidas na via de sinalização do LPS) (Juliana et al., 2012). Além disso, a exposição à rotenona induz a oligomerização de NLRP3 em células renais humanas (Park et al., 2013), e a ativação de NLRP3 em linhagem de células microgliais murinas (Liang et al., 2015). Ainda, a antimicina A, inibidor do complexo III da cadeia respiratória, e o FCCP (carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidraxona), desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, aumentam significativamente a secreção de IL-1 β e produção de ERO em macrófagos murinos (Jabaut et al., 2013). Por outro lado, o uso de antioxidantes mitocondriais inibe a ativação do inflamassoma. Por exemplo, MitoTEMPO, antioxidante específico contra as EROs mitocondriais, reduz a produção de ERO mitocondrial e a ativação do inflamassoma em macrófagos nocautes para a enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2), quando estimulados com LPS e ATP (Mao et al., 2013) e macrófagos murinos expostos ao LPS e palmitato (Weber e Schilling, 2014).

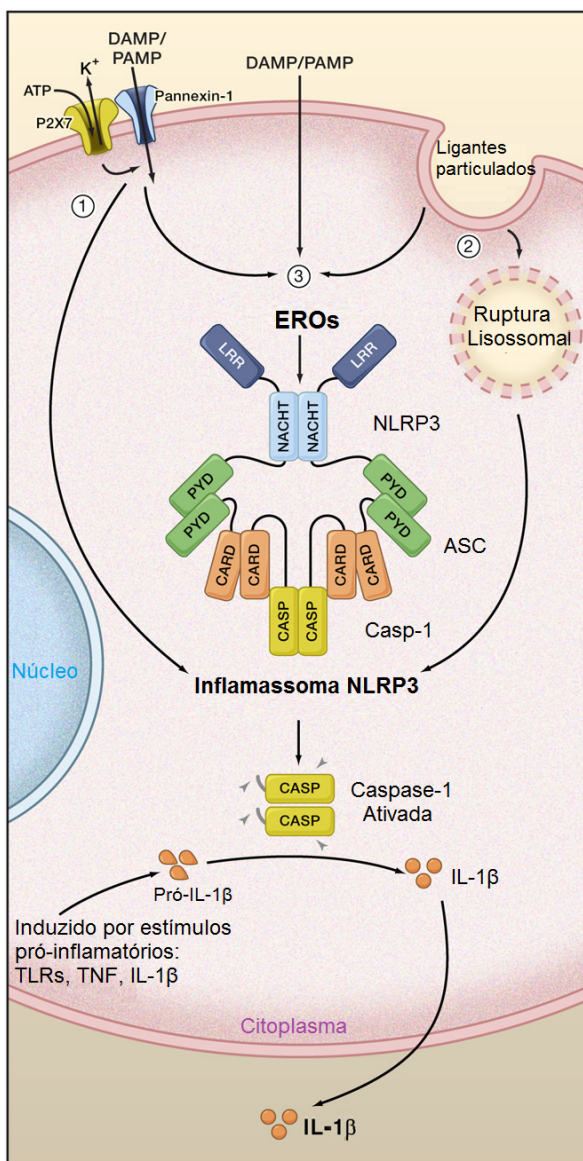


Figura 3. Principais vias de ativação convencional do inflamassoma NLRP3. Em geral, as células não estocam pró-IL-1 β . Dessa forma, existe a necessidade de preparar a célula *priming* para induzir a síntese de pró-IL-1 β mediante a

ativação do fator de transcrição NF- κ B. Posteriormente, os ativadores do inflamassoma NLRP3 devem induzir alterações celulares que levem a sua ativação como, por exemplo, mediante o efluxo de K^+ induzido por ATP, produção de EROs ou ruptura lisossomal induzida por ligantes particulados, como cristais de ácido úrico, asbesto e sílica. Essas alterações levam a oligomerização do receptor NLRP3, recrutamento de ASC e pró-caspase-1, facilitando a sua auto-clivagem e ativação. A caspase-1 ativada promove a clivagem proteolítica de pró-IL-1 β em IL-1 β madura ou ativada, com posterior secreção. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; DAMPs: padrões moleculares associados a perigo; ERO: espécies reativas de oxigênio; LRR: repetições ricas em leucina; NACHT: NAIP, CIITA, HET-E, e TPI; PYD: domínio pirina; CARD: domínio efetor de recrutamento de caspases; CASP: pró-domínio protease formado por p20 e p10. Adaptado de Schroder e Tschopp, 2010.

O exato mecanismo pelo qual as EROs ativam o inflamassoma ainda não está bem definido. A hipótese mais aceita é a de que as EROs induzem a ativação do inflamassoma via proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) (Figura 4). A TXNIP localiza-se no núcleo celular e em condições de estresse oxidativo transloca-se para o citosol ou para a mitocôndria. No citosol, TXNIP associa-se à proteína tiorredoxina 1 (TRX1), e na mitocôndria, à TRX2. A associação com TXNIP, inibe a atividade antioxidante de ambas TRXs (Nishiyama et al., 1999, Saxena et al., 2010). Quando a produção de ERO aumenta, TRX1 é oxidada e o complexo TXNIP/TRX1 se dissocia, permitindo a interação de TXNIP com o domínio LRR do receptor NLRP3, levando à ativação do inflamassoma (Zhou et al., 2010). Na mitocôndria, TRX2 encontra-se associada à proteína quinase reguladora de sinais apoptóticos (ASK) 1. Quando TXNIP transloca-se para a mitocôndria, desacopla o complexo TRX2/ASK e associa-se com TRX2. Assim, TXNIP inibe a atividade antioxidante de TRX2 e ASK1 é liberada e ativada por fosforilação, ativando caspase-3 e induzindo apoptose (Bhattacharyya et al., 2003).

Além desses mecanismos de ativação, pesquisas recentes identificaram que o inflamassoma NLRP3 também pode ser ativado por vias não convencionais que envolvem outras caspases, denominadas de inflamatórias.

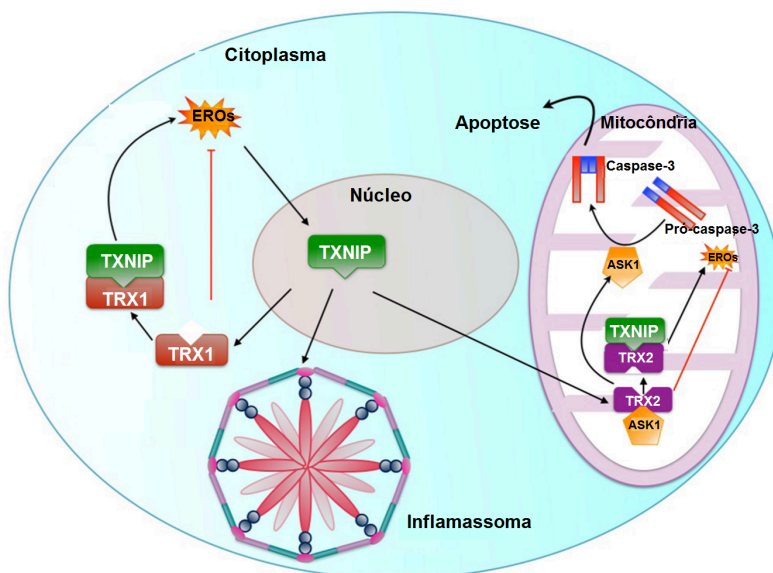


Figura 4: ERO induzem à ativação do inflamassoma via TXNIP. Em condições de estresse oxidativo, TXNIP pode ser transferida do núcleo para o citosol ou mitocôndria. No citosol, TXNIP se associa a TRX1. Em condições de estresse oxidativo, TRX1 é oxidada e a associação é desfeita, permitindo que TXNIP ative o receptor NLRP3. Na mitocôndria, TXNIP desfaz o complexo formado por TRX2 e ASK1, ligando-se a TRX2. ASK1 livre pode ser fosforilada e ativada, mediando a ativação de caspase-3 e induzindo apoptose. TXNIP: proteína de interação com a tioredoxina; TRX: tioredoxina; ASK1: proteína quinase reguladora de sinais de apoptóticos; ERO: espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Harijith et al., 2014.

2.2.2. Ativação não convencional do inflamassoma NLRP3

A ativação não convencional/canônica do inflamassoma NLRP3 é mediada por caspase-11, em camundongos, e pelas caspases-4 e -5, em humanos (Lamkanfi et al., 2002), as quais podem induzir a piroptose em resposta a infecções bacterianas de maneira independente de caspase-1. Kayagaki e colaboradores (2011) demonstraram que a secreção de IL-1 β e IL-18 via caspase-11 era induzida apenas por bactérias gram-negativas e não por outros ativadores clássicos do inflamassoma NLRP3. Em 2013, Hagar e colaboradores (2013) descreveram pela primeira vez que a ativação de caspase-11 é dependente de LPS, enquanto que a ativação de NLRP3 mediada por bactérias gram-positivas não acontece. No

citosol, o LPS pode se ligar a pró-caspase-11 (ou 4/5 em humanos) promovendo sua auto-clivagem e ativação. As enzimas ativadas podem induzir piroptose ou ativar o inflamassoma NLRP3, após um sinal de *priming* (Figura 5) (Hagar et al., 2013).

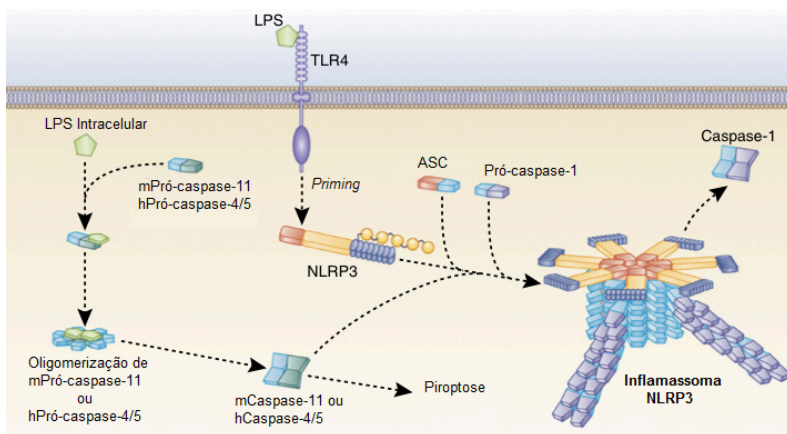


Figura 5. Ativação não convencional do inflamassoma NLRP3. A enzima pró-caspase-11 murina (m Pró-caspase-11) e as pró-caspases 4/5 humanas (hPró-caspases 4/5) podem ligar diretamente ao LPS intracelular, o que induz a oligomerização dessas pró-caspases, e sua auto-clivagem e ativação. Isto é suficiente para a indução de piroptose, mas não para o processamento de IL-1 β . Entretanto, mCaspase-11 e hCaspase-4/5 podem promover a oligomerização e ativação do inflamassoma NLRP3 constituindo a ativação não convencional do inflamassoma NLRP3. LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; TLR4: receptor do tipo *Toll* 4; NLRP3: proteína da família NLR, contendo domínio pirina 3; ASC: proteína semelhante a partícula apoptótica contendo CARD. Adaptado de Guo et al., 2015.

O LPS é amplamente utilizado para induzir respostas inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (Hurme e Seppala, 1988, Henry et al., 2009). O LPS se liga ao receptor de membrana TLR4 (Politorak et al., 1998) ativando uma cascata de sinalização com consequente ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B. Dessa forma o LPS controla a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Fitzgerald et al., 2003). *In vivo*, a administração intraperitoneal (i.p.) de elevadas doses de LPS aumenta a concentração sérica de IL-1 β de maneira dependente de

caspase-11 e -1 (Kayagaki et al., 2011) e de NLRP3 (He et al., 2013b).

2.2.3. Morte celular por piroptose

A ativação do inflamassoma induz a formação de complexos formados por moléculas de ASC oligomerizadas, denominado piroptossoma (Fernandes-Alnemri et al., 2007). A formação do piroptossoma pode levar à piroptose, um tipo de morte celular altamente inflamatória e dependente da atividade de caspase-1 (Fink e Cookson, 2006a). A piroptose frequentemente ocorre em resposta à infecção por patógenos intracelulares (Suzuki et al., 2007, Fink, 2008, Case et al., 2009) e faz parte da resposta antimicrobial. Embora seja considerada uma forma de morte celular programada, é diferente da apoptose, um tipo de morte celular imunologicamente silenciosa. A apoptose caracteriza-se pela ocorrência de várias alterações morfológicas nas células afetadas, que incluem a transposição da fosfatidilserina da camada interna da bicamada lipídica celular para a externa, condensação e agregação da cromatina e fragmentação nuclear, e por fim, formação de corpos apoptóticos (Kerr et al., 1972). A piroptose, por sua vez, é acompanhada por clivagem do DNA e condensação nuclear, influxo de água causando inchaço e consequente ruptura da membrana celular e liberação do conteúdo celular pró-inflamatório (Fink e Cookson, 2006, Molofsky et al., 2006). Assim, tanto o complexo formado por ASC oligomerizada, como caspase-1, IL-1 β e IL-18 podem ser liberadas no meio extracelular, onde ASC oligomerizada pode ser fagocitada por células vizinhas e continuar ativa levando à ativação de caspase-1, liberação de citocinas e propagação da inflamação (Balci-Peynircioglu et al., 2008, Franklin et al., 2014) (Figura 6).

2.2.4. Ativação do inflamassoma em doenças

Apesar de sua importância na resposta imune, como já mencionado, a ativação do inflamassoma também está envolvida na fisiopatologia de diversas doenças. Por exemplo, mutações que geram ganho de função no domínio NACHT de NLRP3 estão envolvidas nas síndromes periódicas associadas a criopirina (CAPS), nome derivado da designação inicial do gene que codifica NLRP3. Dentre essas doenças estão a síndrome auto-inflamatória familiar associada ao frio (FCAS), síndrome de Muckle-Wells (MWS) e doença auto-inflamatória multissistêmica neonatal/ síndrome neurológica cutânea articular crônica infantil (NOMID/CINCA) (Aganna et al., 2002). Essas síndromes constituem um espectro de doenças com severidade variada, com FCAS, MWS e NOMID/CINCA representando as formas moderada,

intermediária e severa, respectivamente. Clinicamente são caracterizadas por febres recorrentes, urticária, inflamações oculares e nas articulações, amiloidose e, no caso de NOMID/CINCA, complicações neurológicas (Muckle e Wellsm, 1962, Lampert, 1986, Hoffman et al., 2001, Aksentijevich et al., 2002).

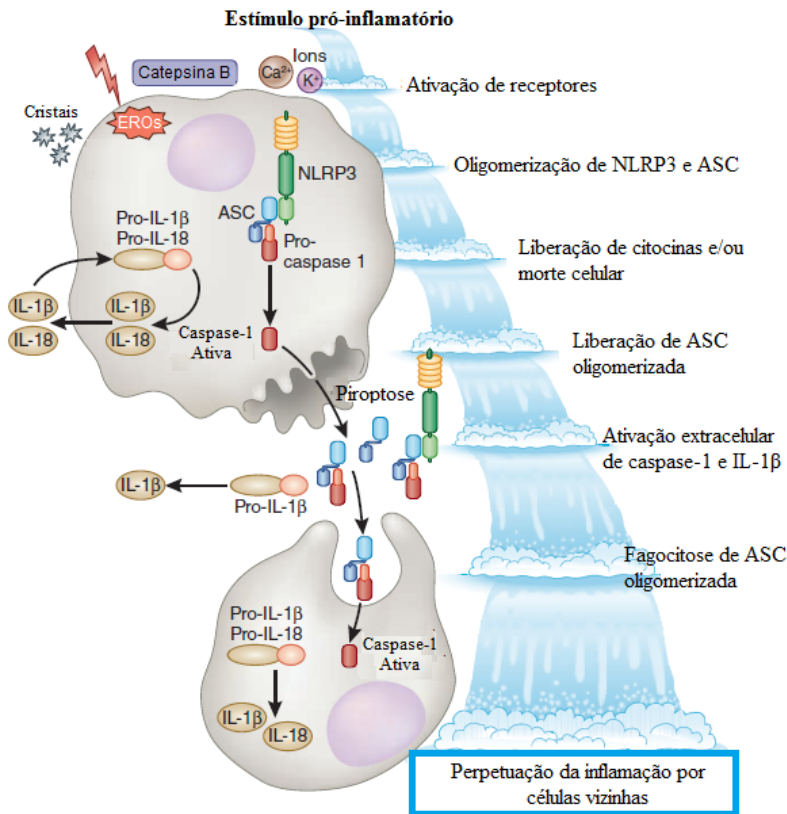


Figura 6: A ativação do inflamassoma contribui para o processo de piroptose. A ativação de caspase-1 leva a morte celular por piroptose, caracterizada por ruptura da membrana celular e extravasamento do conteúdo inflamatório: ASC oligomerizada, caspase-1 ativada, IL-1β e IL-18. ASC oligomerizada pode ser endocitada por células vizinhas, ativando caspase-1 e propagando a inflamação. ERO: espécies reativas de oxigênio; NLRP3: proteínas receptoras do tipo NOD; ASC: proteína semelhante a partícula apoptótica contendo um CARD; IL-1β: interleucina 1β; IL-18: interleucina 18. Adaptado de Broderick e Hoffman,

2014.

A ativação inapropriada do inflamassoma NLRP3 também está envolvida na maioria das doenças de progressão crônica. Por exemplo, metabólitos acumulados em doenças de progressão crônica, como por exemplo, cristais de urato monossódico na gota (Martinon et al., 2006), placas de β -amilóide na doença de Alzheimer (Halle et al., 2008, Heneka et al., 2013), polipeptídeo β -amilóide das ilhotas pancreáticas no diabetes do tipo 2 (Masters et al., 2010), ou cristais de colesterol na aterosclerose (Duewell et al., 2010), provocam a ativação do complexo inflamassoma.

2.2.5. Ativação do inflamassoma NLRP3 em doenças do SNC

O papel do inflamassoma em doenças do SNC começou a ser investigado recentemente. A ativação do inflamassoma no SNC é considerada um dos passos primários e críticos para a neuroinflamação induzida por PAMPs e DAMPs, seguida pela produção e secreção de quimiocinas e citocinas (de Rivero Vaccari et al., 2009, Jha et al., 2010). Inflamassomas ativados têm sido identificados no tecido cerebral de pacientes e em modelos animais de doenças que afetam o SNC. Também foram identificados em células nervosas estimuladas com produtos metabólicos envolvidos na fisiopatologia de doenças do SNC, como por exemplo, o polipeptídeo β -amilóide (Halle et al., 2008, Heneka et al., 2013).

A ativação do inflamassoma NLRP3 já foi identificada na substância branca de pacientes sorologicamente positivos para o HIV, evidenciada pelo aumento na expressão de IL-1 β , caspase-1 e ASC (Walsh et al., 2014). Experimentalmente, a ativação do inflamassoma NLRP3 foi observada em estruturas cerebrais de animais submetidos a estresse crônico moderado (Pan et al., 2014), diabetes associado ao parkinsonismo induzido por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (Wang et al., 2014), e epilepsia induzida por estimulação elétrica (Meng et al., 2014). Ademais, foi observada no tecido nervoso de camundongos com mutações nas proteínas precursora de β -amilóide e presenilina 1, modelo genético da doença de Alzheimer que mimetiza a deposição de placas amilóides (Garcia-Alloza et al., 2006).

Também existem evidências da ativação do inflamassoma NLRP3 *in vitro*. Por exemplo, induzido pelo peptídeo β -amilóide e α -sinucleína, proteínas envolvidas nas doenças de Alzheimer e Parkinson,

respectivamente, em cultura de microglia murina (Halle et al., 2008, Codolo et al., 2013). Adicionalmente, compostos usados para induzir modelos experimentais da doença de Parkinson, como o MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina), também induzem a ativação do inflamassoma NLRP3, evidenciado pelo conteúdo elevado de NLRP3, caspase-1 e IL-1 β em cultura astrocitária de córtex de ratos neonatos (Lu et al., 2014).

2.2.6. Tratamento de doenças que cursam com ativação do inflamassoma

O tratamento de condições associadas à ativação excessiva do inflamassoma visam bloquear a citocina IL-1 β , principal produto piogênico da atividade dos inflamassomas, ou seus efeitos através do bloqueio do seu receptor. Por exemplo, a inibição da atividade de IL-1 β , mediante anticorpo direcionado contra IL-1, canakinumabe, é usada como estratégia terapêutica para o tratamento de MWS e FCAS em ensaios clínicos (Lachmann et al., 2009a). A inibição do receptor de IL-1 pelo antagonista do receptor de IL-1 humano, anakinra, também tem sido utilizada no tratamento de artrite reumatóide, e previne a degeneração da cartilagem associada a essa patologia (Kone-Paut e Galeotti, 2014). Ensaios clínicos com o anticorpo para IL-18, GSK1070806, também tem sido realizados. Testes em indivíduos saudáveis e obesos mostraram que o anticorpo foi efetivo em neutralizar IL-18 e apresentou efeitos adversos moderados (Mistry et al., 2014), porém ainda não é utilizado na clínica. Em suma, a inibição do inflamassoma por si só seria mais efetiva do que inibidores das citocinas, já que inibiria a indução de morte celular por piroptose além de bloquear a secreção de IL-1 β e IL-18, em vez de inibir apenas seus efeitos.

2.2.7. Inibidores do inflamassoma NLRP3

Os inibidores do inflamassoma podem atuar em todos os passos essenciais para a formação do complexo, como na ativação de NF- κ B e do receptor NLRP3, na oligomerização de ASC ou na ativação de caspase-1, como apresentado na tabela 1. Alguns desses compostos já apresentaram resultados clínicos, enquanto outros foram testados apenas em modelos animais e em sistemas *in vitro*.

Tabela 1: Compostos que inibem a ativação do inflamassoma NLRP3 e seus mecanismos de ação.

Composto	Mecanismo de inibição do inflamassoma NLRP3	Referência
Partenolide	Inibe a ativação de NF- κ B, a atividade ATPase de NLRP3 e a atividade de caspase-1 por alquilação de resíduos cisteína	Juliana et al., 2010
AZD9056	Inibição do efluxo de K ⁺ e de P2X7R	Keystone et al., 2012
β -hidroxibutirato	Inibição do efluxo de K ⁺	Youm et al., 2015
Curcumina	Inibição do efluxo de K ⁺ , da ruptura lisossomal e da produção de ERO	Gong et al., 2015
Resveratrol	Induz a ubiquitinação e autofagia de NLRP3 e inibe a produção de ERO	Chang et al., 2015
Dopamina	Induz a ubiquitinação e autofagia de NLRP3	Yam et al., 2015
Glibenclamida	Inibe canais de K ⁺ sensíveis ao ATP	Lamkanfi et al., 2009
MCC950	Inibe a oligomerização de ASC	Coll et al., 2015

Dentre os compostos mencionados, o único empregado em pacientes como potencial inibidor do inflamassoma foi o AZD9056, o qual reduziu a inflamação das articulações em pacientes com artrite reumatóide quando administrado por via oral (Keystone et al., 2012). Todos os outros compostos mostraram inibição da ativação do inflamassoma NLRP3 em cultura de macrófagos ou monócitos murinos ou humanos (Lamkanfi et al., 2009, Juliana et al., 2010, Chang et al., 2015, Coll et al., 2015, Gong et al., 2015, Yan et al., 2015). Particularmente, o partenolide e a curcumina também inibem a ativação do inflamassoma NLRP3 induzido, respectivamente, por etanol em cultura organotípica hipocampal e por glutamato em fatias hipocampais, além de reduzir os efeitos deletérios do etanol na neurogênese hipocampal (Zou e Crews, 2012, Li et al., 2015).

Além dos efeitos já citados, a maioria desses compostos também exercem efeitos anti-inflamatórios *in vivo*. Por exemplo, o β -hidroxibutirato e o resveratrol, atenuam a infiltração de células imunes e a secreção de IL-1 β induzidas, respectivamente, por cristais de ácido úrico no peritônio e no modelo de nefropatia progressiva no tecido renal de camundongos (Chang et al., 2015, Youm et al., 2015). O resveratrol também reduz o volume de infarto e fibrose do miocárdio e a ativação do inflamassoma NLRP3 induzido por lesão de isquemia-reperusão do miocárdio em ratos (Dong et al., 2015). Já a dopamina reduz a secreção sérica de citocinas dependentes do inflamassoma NLRP3 (Yan et al., 2015), enquanto a curcumina inibe a secreção de IL-1 β no lavado

peritoneal e as alterações hepáticas induzidas pela administração i.p. de LPS, aumentando a sobrevivência dos camundongos (Gong et al., 2015). A curcumina também reduz a ativação do inflamassoma NLRP3, a área cerebral infartada e o dano neuronal induzidos por oclusão da artéria cerebral no hipocampo de ratos (Li et al., 2015). Ainda, o MCC950, composto contendo diarilsulfoniluréia, atenua a severidade dos sintomas em modelos animais de doenças onde a atividade de NLRP3 é essencial, como encefalomielite autoimune experimental, que mimetiza a esclerose múltipla em humanos, e de doenças auto-inflamatórias da família CAPS (Coll et al., 2015).

2.3. NEOPTERINA: BIOMARCADOR EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

Os processos inflamatórios são caracterizados pelo aumento no número de células imunes ativadas, além da concentração de citocinas e quimiocinas (Henry et al., 2009, Suh et al., 2014). Algumas moléculas sintetizadas durante a inflamação, como proteína C-reativa e neopterina, podem ser mensuradas e utilizadas como biomarcadores periféricos a fim de caracterizar precocemente, avaliar a progressão, ou bem monitorar o tratamento paliativo em processos sistêmicos e/ou neurológicos (Brodacki et al., 2008, Molero-Luis et al., 2013, Wissmann et al., 2013, Suh et al., 2014). Nesse contexto, a mensuração de elevadas concentrações de neopterina tem sido relacionada com o desenvolvimento e progressão de doenças com comprometimento neurológico, como as doença de Alzheimer e Parkinson (Hull et al., 2000, Widner et al., 2002, Azumagawa et al., 2003, Frick et al., 2004, Molero-Luis et al., 2013, Parker et al., 2013, Wissmann et al., 2013).

2.3.1. Síntese de neopterina

A neopterina é uma pteridina que é formada durante a síntese de BH4, um cofator obrigatório para as enzimas fenilalanina, tirosina e triptofano hidroxilases, alquilglicerol monooxigenase (para revisão ver Werner et al., 2011), e para as três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS; NOS1 ou neuronal, NOS2 e NOS3 ou endotelial) (Mayer et al., 1990). As concentrações intracelulares de BH4 são mantidas por múltiplas rotas metabólicas, denominadas vias *de novo*, de salvação e de reciclagem. A via *de novo* produz BH4 a partir de guanosina trifosfato (GTP) pela ação das enzimas guanosina trifosfato ciclohidrolase I (EC 3.5.4.16; GTPCH), 6-piruvil tetrahidropterina sintase (EC 4.6.1.12; PTPS) e sepiapterina redutase (EC 1.1.1.153; SR) (Nichol et al., 1985).

A enzima GTPCH cataliza a conversão de GTP em 7,8-dihidroneopterina trifosfato, a qual tem os fosfatos removidos pela PTPS para gerar 6-piruvoil-tetrahydropterina, que dará origem a BH4 em uma reação catalisada pela SR (Werner et al., 1990) (Figura 7).

GTPCH é a enzima limitante da via *de novo* (Levine et al., 1990) e é regulada transcricionalmente por IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , fator de crescimento do nervo, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), entre outros (Huber et al., 1984, D'Sa et al., 1996, Bauer et al., 2002, Franscini et al., 2003, Ishii et al., 2005). Enquanto a atividade de GTPCH pode ser estimulada em até 100 vezes durante condições inflamatórias, a atividade de PTPS e SR encontra-se minimamente aumentada nas mesmas condições (Kerler et al., 1989, Werner et al., 1990, Werner-Felmayer et al., 1993a, Kaneko et al., 2003). Assim, durante estados inflamatórios, a PTPS torna-se a enzima limitante na biosíntese *de novo* de BH4 (Werner et al., 1990, Werner-Felmayer et al., 1993b), especialmente em monócitos e macrófagos humanos, desde que essas células possuem baixa expressão de PTPS (Werner et al., 1990). Portanto, o metabólito intermediário 7,8-dihidroneopterina trifosfato será desfosforilado por fosfatases alcalinas gerando 7,8-dihidroneopterina (7,8-NH₂) que, por oxidação não enzimática, originará neopterina. Entretanto, a produção de biopterina (estado de máxima oxidação de BH4) estará favorecida em monócitos e macrófagos murinos ou células neuronais humanas, as quais expressam PTPS em maior quantidade, onde baixas concentrações de neopterina serão acumuladas (Werner-Felmayer et al., 1993b).

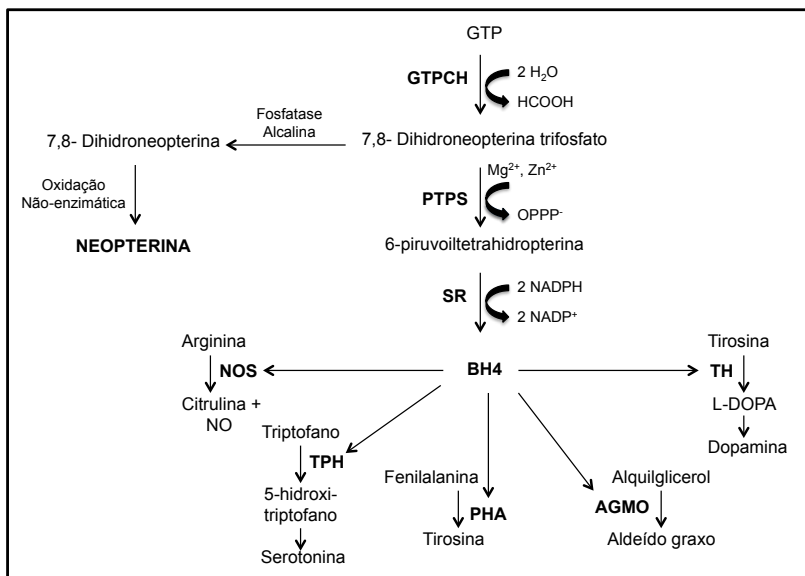


Figura 7. Síntese de neopterina a partir da via de síntese *de novo* de BH4. Neopterina é formada quando existe acúmulo do intermediário metabólico 7,8-dihidroneopterina trifosfato. Este será desfosforilado por fosfatases alcalinas gerando 7,8-dihidroneopterina que, por oxidação não enzimática, originará neopterina. BH4: tetrahydrobiopterina; GTP: guanosina trifosfato; GTPCH: guanosina trifosfato ciclohidrolase I; PTPS: 6-piruviltetrahydropterina sintase; SR: sepiapterina redutase; NOS: todas as isoformas de óxido nítrico sintase; TPH: triptofano hidroxilase; PHA: fenilalanina hidroxilase; TH: tirosina hidroxilase; AGMO: alquilglicerol monooxigenases; ON: óxido nítrico. Adaptado de Ghisoni et al., 2015.

2.3.2. A neopterina é um biomarcador periférico da resposta imune celular

A neopterina é um reconhecido biomarcador de ativação do sistema imune, quando células T *helper* 1 (Th1) secretam IFN- γ , um dos principais estímulos da síntese de neopterina em monócitos, macrófagos e células dendríticas (Fuchs et al., 1989b, Cano et al., 2008, Molero-Luis et al., 2013). Ademais, a fim de estimular a síntese de óxido nítrico (ON), o IFN- γ também modula positivamente a expressão de NOS2 em células imunes ativadas, aumentando sua atividade enzimática e requerendo altas concentrações de cofatores, incluindo o

cofator essencial BH4 (Salvemini et al., 1992). Dessa forma, GTPCH é positivamente modulada, sobrepondo a capacidade de PTPS e levando ao acúmulo de 7,8-dihidroneopterina trifosfato, com a consequente conversão não enzimática a neopterina (Schoedon et al., 1987, Werner et al., 1990) (Figura 7).

A concentração de neopterina pode elevar-se no plasma e no LCR, podendo ser, portanto, considerada como um biomarcador sensível e precoce da ativação do sistema imune (Huber et al., 1984, Wirleitner et al., 2002). Em adultos saudáveis, espera-se encontrar valores de neopterina entre 5 e 8 nmol/L no plasma, soro ou LCR (Hagberg et al., 1993, Widner et al., 2002, Casal et al., 2003, Kuehne et al., 2013, Hytonen et al., 2014). Esses valores são pelo menos 2 a 3 vezes maiores em condições patológicas caracterizadas por ativação do sistema imune. Por exemplo, a concentração de neopterina atinge mais de 15 nmol/L no plasma e 10 nmol/L no LCR de pacientes HIV não tratados (Suh et al., 2014), e próximo de 16 nmol/L em plasma de pacientes com Alzheimer em estágios avançados de demência (Wissmann et al., 2013). Em casos de doenças metabólicas hereditárias caracterizadas pela deficiência de PTPS, o metabólito pode atingir aproximadamente 500 nmol/L no LCR (Niederwieser et al., 1979, Blau et al., 1996, Opladen et al., 2012). Além disso, a concentração de neopterina atinge até 30 nmol/L no plasma de atletas após exercício físico de resistência (de Lucas et al., 2014).

Vários estudos utilizam a relação entre as concentrações de neopterina e triptofano como marcador de ativação do sistema imune em doenças que cursam com inflamação (Fuchs et al., 1990, Widner et al., 2000, Lim et al., 2015). O triptofano, aminoácido essencial, pode ser utilizado para a síntese proteica (menos de 1%) ou ser metabolizado em 4 vias metabólicas, sendo a via das quinureninas a mais importante quantitativamente. Mais de 95% do triptofano da dieta é metabolizado pela via das quinureninas hepática (Bender, 1983), a qual contém o conjunto de enzimas necessárias para a síntese de nicotinamida e NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e a completa oxidação do triptofano a CO₂ e água. Em condições inflamatórias, a secreção de IFN- γ modula positivamente a expressão gênica e atividade da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO)-1, a enzima limitante da via das quinureninas (Figura 8) (Takikawa et al., 1986, Dai e Gupta, 1990). Existem outras enzimas limitantes do metabolismo do triptofano como triptofano dioxigenase (TDO), expressa no fígado (Takikawa et al., 1986, Rafice et al., 2009), e IDO-2, recentemente descrita nos rins, fígado e sistemas reprodutores feminino e masculino (Ball et al., 2009). A via das quinureninas representa a principal via de metabolismo do

triptofano no SNC, onde é catalisada por IDO-1. Na via das quinureninas, o triptofano é metabolizado à N-formil-L-quinurenina, a qual é convertida a quinurenina, reação catalisada por formamidases ou arilformidases. A quinurenina pode ser catabolizada por diversas enzimas formando metabólitos neuroativos como ácido quinolínico, ácido quinurênico e ácido picolínico (Stone, 1993). A determinação da atividade de IDO-1 e da concentração dos metabólitos da via das quinureninas também são indicadores de ativação do sistema imune.

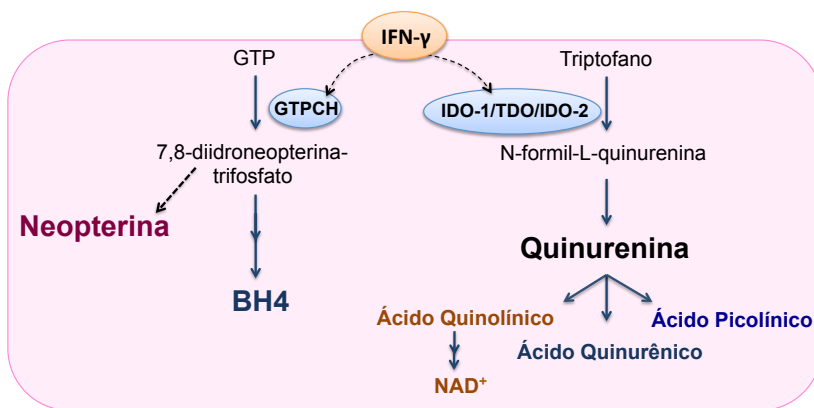


Figura 8. Papel do IFN- γ na síntese simultânea de neopterina e quinurenina. O IFN- γ modula positivamente a transcrição gênica e a atividade de GTPCH e IDO-1, enzimas limitantes na via de síntese *de novo* de BH4 e na via das quinureninas, respectivamente. Na via das quinureninas, IDO-1, TDO-2 ou IDO-2 catalizam a conversão do aminoácido triptofano à N-formil-L-quinurenina, a qual é metabolizada à quinurenina. Este intermediário pode dar origem a vários metabólitos, como ácido quinolínico, ácido quinurênico e ácido picolínico. O produto final da via é o NAD⁺ sintetizado a partir de ácido quinolínico. IFN- γ : interferon- γ ; GTPCH: guanosina trifosfato ciclodrolase I; IDO-1: indoleamina-2,3-dioxigenase 1; TDO: triptofano dioxigenase; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo.

2.3.3. Produção de neopterina no SNC

A origem de neopterina no SNC ainda não está bem esclarecida. Contudo, a literatura sugere que a neopterina possa atravessar a BHE e sua concentração no LCR reflete as concentrações séricas ou

plasmáticas (Fuchs et al., 1989a). Entretanto, além desse processo ocorrer em um quociente muito baixo (1:40) (Hagberg et al., 1993), as concentrações de neopterina são maiores no LCR do que no plasma ou soro em algumas condições, como no dano cerebral traumático (Lenzlinger et al., 2001) e infecções das meninges cerebrais (Yoshida et al., 1999, Azumagawa et al., 2003), indicando que a pteridina poderia ser produzida por células nervosas. De acordo com a hipótese de produção de neopterina no SNC, Kuehne e colaboradores (2013) relataram que a concentração de neopterina no LCR é superior à concentração observada no soro de pacientes psiquiátricos com funções normal (LCR 7,4 nmol/L; soro 4,9 nmol/L) e comprometida da BHE (LCR 8,9 nmol/L; soro 6,6 nmol/L). Ainda, nosso grupo de pesquisa mostrou que a neopterina pode ser produzida por células nervosas em condições de estresse mitocondrial e oxidativo usando um sistema experimental baseado no uso de compostos mitotóxicos em tecido cerebral de roedores (Ghisoni e Latini, 2015).

Considerando que astrócitos e microglia são as células nervosas mais abundantes no SNC, e que ambos expressam NOS em resposta a IFN- γ (Salvemini et al., 1992, Zielasek et al., 1992), essas células da glia podem ser consideradas boas candidatas quanto a síntese de neopterina no SNC. Além disso, desde que a neopterina é um subproduto da ativação da via *de novo* de BH₄, células produtoras desses compostos também poderiam formar a pteridina. De acordo com Sawada e colaboradores (1987), concentrações maiores de neopterina em relação a biopterina foram encontradas em regiões de neurotransmissão cerebral dependentes de BH₄, incluindo hipocampo, amígdala, *locus coeruleus*, substância negra, núcleo da rafe, núcleo accumbens, núcleo caudado e putamen de humanos sem história clínica de doenças neurológicas, apontando a existência da produção neuronal da pteridina.

2.3.4. Efeitos biológicos da neopterina

Embora existam mais de três mil publicações cadastradas no buscador médico *PubMed* sobre a identificação desta molécula em diferentes situações patológicas, o papel fisiológico da neopterina ainda é virtualmente desconhecido (consulta realizada em 18/01/2016 www.PubMed.com) tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP). Apesar de poucos estudos relatarem os efeitos extracelulares da neopterina, como mostrado na tabela 2, os dados são contraditórios e difíceis de serem extrapolados para a fisiologia humana, principalmente porque, em geral, as concentrações usadas nestas contribuições científicas chegam a ser mais de duas mil vezes maiores do que as

concentrações de neopterinina encontradas no plasma ou LCR de indivíduos saudáveis (Hagberg et al., 1993, Widner et al., 2002, Casal et al., 2003, Kuehne et al., 2013, Hytonen et al., 2014). Esses poucos estudos mostram que a neopterinina e seu precursor desfosforilado, 7,8-NH₂, induzem efeitos *in vitro* similares, como translocação de NF- κ B, aumento de Ca²⁺ intracelular, produção de ERO, expressão elevada de proto-oncogenes, apoptose, além de reduzida viabilidade celular em diferentes células humanas e de roedores (Tabelas 2 e 3). Entretanto, quando células neurais são expostas aos metabólitos, 7,8-NH₂ exerce ação tóxica em concentrações entre 400 nM e 5 mM, nas quais a neopterinina foi protetora ou não teve efeito (Tabelas 2 e 3). Deve-se reforçar que não existem relatos da presença de 7,8-NH₂ em fluidos biológicos, mesmo em situações onde a via é totalmente comprometida, como a deficiência de PTPS, ou seja, o acúmulo de 7,8-NH₂ parece não ocorrer *in vivo* (Leuzzi et al., 2010).

Apesar das evidências mencionadas na Tabela 2 e do já conhecido papel como biomarcador periférico de processos inflamatórios, dados do nosso grupo de pesquisa têm sugerido que a neopterinina pode exercer um efeito neuroprotetor (Ghisoni e Latini, 2015, Ghisoni et al., 2015). Recentemente demonstrou-se que a neopterinina aumenta a resistência ao estresse oxidativo no córtex cerebral de camundongos (Ghisoni e Latini, 2015), facilita a aquisição da memória do tipo aversiva e a geração de LTP hipocampal, além de apresentar ação anti-inflamatória quando administrada por via intracerebroventricular (Ghisoni et al., 2016). Estes dados foram observados principalmente na dose de 4 pmol, que geraria uma concentração de aproximadamente 150 nM de neopterinina no LCR.

Tabela 2: Efeitos extracelulares da neopterina em sistemas celulares *in vitro*.

Espécies	Tipo celular	Tratamento	Efeito
Roedores	Células do músculo liso vascular	20 µM; 2 horas	Modulação positiva da expressão do fator nuclear kappa B (NF-κB) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) (Hoffmann et al., 1996).
	Linhagem de células epiteliais alveolares	1 - 1000 µM; 24 horas	Indução de apoptose (Schobersberger et al., 1996).
		1 - 1000 µM; 6 - 24 horas	Indução da expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 (Hoffmann et al., 1999).
		1 - 1000 µM; 1 hora	Modulação positiva da expressão de NF-κB (Hoffmann et al., 1999).
		100 nM; 10 min	Inibição da secreção de Ca ²⁺ induzida por ATP (Hoffmann et al., 2002).
	Linhagem de fibroblastos embrionários	400 nM; 18 horas	Modulação positiva da expressão gênica de <i>c-fos</i> na presença de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Uberall et al., 1994).
Humanos	Linhagem de monócitos THP-1	1 µM; 1 min	Elevação na concentração de Ca ²⁺ intracelular (Woll et al., 1993).
	Cultura de células endoteliais da artéria coronária	10 - 100 nM; 30 min	Modulação positiva da expressão de NF-κB (Cirillo et al., 2006).
	Cultura primária de neutrófilos	400 µM; 3 min	Inibição da liberação de oxigênio <i>single</i> induzida por zymozan opsonizado (Mori et al., 2010).
	Linhagem de linfoma histiocítico U937	0,5 - 1000 µM; 24 horas	Indução de apoptose (Baier-Bitterlich et al., 1995).
	Linhagem de astroglioma U373MG	1 mM; 2 ou 5 dias	Neopterina não alterou a morfologia nem a proliferação celular (Speth et al., 2000).
	Linhagem de microglia CHME	0,1 - 1 mM; 5 dias	Neopterina não alterou a proliferação celular (Speth et al., 2000).
	Linhagem neuronal SK-N-SH	0,1 - 1 mM; 5 dias	Neopterina não alterou a proliferação celular (Speth et al., 2000).

Adaptado de Ghisoni et al., 2015.

Tabela 3: Comparação dos efeitos extracelulares *in vitro* de neopterina (NEO) e 7,8-dihidroneopterina (7,8-NH2) em diferentes sistemas celulares.

Efeito	NEO	7,8-NH2
Apoptose em cultura de bactérias (200 µM; 24 h) (Weiss et al., 1993).	+	-
Apoptose em linhagem de células epiteliais alveolares murinas (200µ M; 24h) (Schobersberger et al., 1996).	+	+
Apoptose em linhagem de células tipo neurônios (PC12) (5 e 1mM; 48 h) (Enzinger et al., 2002).	-	+
Viabilidade comprometida e alteração na morfologia em linhagem celular de astrócitos (U373MG), microglia (CHME) e neurônios (SK-N-SH) (0.1 a 5 mM; 5 dias) (Speth et al., 2000).	-	+
Indução de genes relacionados ao crescimento celular em fibroblastos (NIH3T3) (NEO ou 7,8-NH2 400 nM em combinação com GMPc (20 µM) (Uberall et al., 1994).	+	+

Adaptado de Ghisoni et al., 2015.

A resistência ao estresse oxidativo induzido pela administração de neopterina foi caracterizada pelo aumento na concentração de glutatona (GSH), o principal antioxidante intracelular, e pela razão da atividade das enzimas antioxidantes glutatona redutase (GR) / glutatona peroxidase (GPx) (Ghisoni e Latini, 2015). A GR catalisa a regeneração de GSH, enquanto a GPx catalisa a sua oxidação na detoxificação de ERO. A transcrição dessas enzimas antioxidantes é dependente da ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE), região comum nas regiões promotoras nos genes que codificam enzimas antioxidantes, a qual é regulada principalmente pela ligação de fatores de transcrição, como o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), às sequências ARE (Shih et al., 2003). Em condições fisiológicas, Nrf2 inativo encontra-se ligado à proteína associada ao citoesqueleto, Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), no citoplasma. Por outro lado, em condições de estresse oxidativo, Keap1 se dissocia de Nrf2, o qual é translocado para o núcleo, onde se associa com um membro da família de proteínas Maf, formando um dímero (Figura 9) (Itoh et al., 2003). Além de GR e GPx, a ativação de ARE regula a transcrição de outras enzimas antioxidantes, como heme-oxigenase-1 (HO-1) e enzimas de detoxificação de fase II, como glutatona transferases (Prester et al., 1995).

Assim, a neopterina parece apresentar um papel dual, ou seja, altas concentrações estariam relacionadas com um papel pró-tóxico (como mostrado na tabela 2), enquanto concentrações ligeiramente acima das concentrações basais, exerceriam um papel neuroprotetor, como já foi descrito para numerosas biomoléculas, como IL-6 (Li et al.,

2009b), IL-1 β (Lampa et al., 2012), dopamina (Filloux e Townsend, 1993), entre outros.

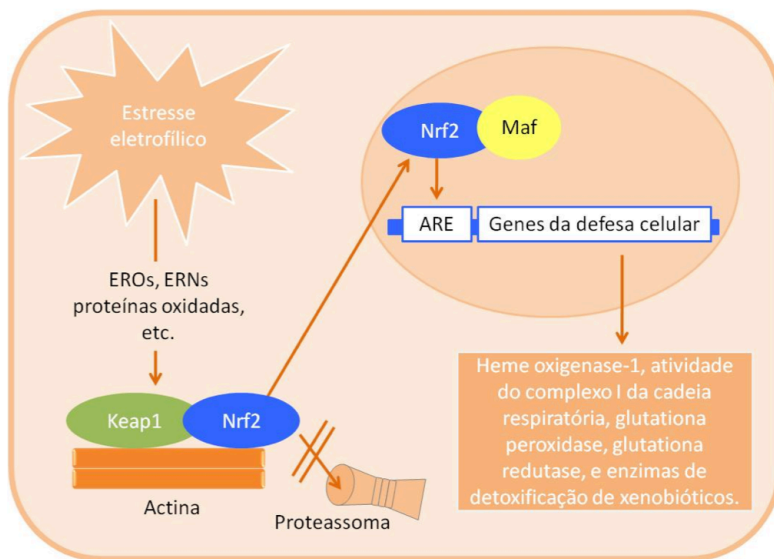


Figura 9. Papel do sistema Keap1-Nrf2-ARE na regulação da resposta antioxidante. As espécies reativas geradas durante o estresse eletrofilico oxidam o resíduo cisteína que confere a ligação do complexo Nrf2-Keap1, impedindo sua degradação proteassomal. O Nrf2 livre transloca-se para o núcleo, onde forma um dímero com proteínas da família Maf, ativando a região ARE e a transcrição de enzimas antioxidantes. ERO: espécies reativas de oxigênio; ERNs: espécies reativas de nitrogênio; Keap1: do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*; Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2; ARE: elemento de resposta antioxidante. Adaptado de Goldring et al., 2006.

Doenças caracterizadas por neuroinflamação geralmente apresentam elevadas concentrações de neopterin e citocinas nos fluidos biológicos (Azumagawa et al., 2003, Parker et al., 2013). Entretanto, o papel da produção de neopterin nessas doenças ainda é desconhecido. As citocinas, além de atuarem como reguladores imunes, são essenciais para sinalização parácrina e autócrina em células nervosas neurais e não neurais que fazem parte do SNC adulto e em desenvolvimento. Assim, alterações na regulação imune como infecções maternas, podem afetar processos normais do desenvolvimento (para revisão ver Goines e

Ashwood, 2013). Portanto, estudar a biologia, funções e relação da neopterina com outros mediadores inflamatórios no SNC pode ajudar na compreensão dos mecanismos patológicos em doenças do desenvolvimento, como o autismo.

2.4. TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O termo transtorno do espectro autista (TEA) compreende um grupo de doenças do desenvolvimento as quais estão associadas a prejuízos na função afetiva e/ou interação social, anormalidades na comunicação oral e comportamento repetitivo (APA, 2014). O termo TEA inclui autismo, síndrome de Asperger e distúrbio abrangente do desenvolvimento não especificado. Em geral, os sintomas de autismo iniciam-se aos 6 meses de idade, estabelecendo-se entre 2 e 3 anos e tendem a permanecer durante a vida (para revisão ver Rapin e Tuchman, 2008). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência de TEA a nível global corresponde a 1 em cada 160 crianças (OMS, 2013). Ainda, é mais prevalente em homens, com uma razão homem:mulher de 4,1:1 (Fombonne, 2009). Cerca de 70% dos indivíduos autistas não apresentam anormalidades físicas, mas em 30% dos casos, o autismo está associado com características dismórficas como microcefalia e/ou malformação da estrutura cerebral (Miles et al., 2005). Em 5-10% dos casos o autismo é diagnosticado em associação com outras doenças como as síndromes do X frágil, de Rett e de Down (Rutter et al., 1994).

Nos últimos anos, os avanços na pesquisa sobre as bases neurobiológicas do TEA têm apresentado algumas evidências neuropatológicas relacionadas ao autismo. Dentre elas podemos citar o crescimento acelerado e anormal do cérebro no início da infância (Redcay e Courchesne, 2005), desenvolvimento neuronal restrito com indícios de anormalidades na citoarquitetura cerebral (Bailey et al., 1998, van Kooten et al., 2008, Wegiel et al., 2010), modificações metabólicas com processamento anormal da proteína precursora amiloide (Bailey et al., 2008), indução de estresse oxidativo (James et al., 2009) e ativação de células da glia (Vargas et al., 2005).

Apesar da etiologia do TEA não ser bem definida, esta parece envolver a predisposição genética e fatores ambientais. A relevância da predisposição genética para o desenvolvimento de TEA é um tema bastante discutido. Alguns estudos avaliando pacientes com TEA e seus familiares mostram que indivíduos com desenvolvimento normal apresentam alterações imunes semelhantes aos irmãos diagnosticados com TEA (Saresella et al., 2009, Napolioni et al., 2013), sugerindo que a

hereditariedade contribui no desenvolvimento da doença. Por outro lado, estudos genômicos mostram que crianças diagnosticadas com TEA apresentam mutações *de novo* (que não foram herdadas) não observadas no DNA dos pais, irmãos não afetados ou controles (Miller et al., 2009, Krumm et al., 2015, Tammimies et al., 2015), sugerindo que essas alterações sejam decorrentes de fatores ambientais.

Entre os fatores ambientais capazes de prejudicar o desenvolvimento do SNC pode-se citar a exposição a metais pesados, drogas de abuso e infecções pré-natais (Atladdottir et al., 2010, Hashimoto-Torii et al., 2011). Particularmente, evidências mostram uma forte correlação entre TEA e infecções virais maternas durante o primeiro trimestre de gestação (Atladdottir et al., 2010), quando a BHE ainda não está formada. O desenvolvimento do TEA também tem sido associado com doenças autoimunes familiares (Comi et al., 1999) e a presença de auto-anticorpos contra proteínas essenciais na homeostasia do SNC, como a proteína básica da mielina, um constituinte da bainha de mielina que envolve os axônios (Mostafa e Al-Ayadhi, 2011). Portanto, a resposta imune e a inflamação parecem ser componentes chave na patogênese desta síndrome.

Estudos prévios já demonstraram que pacientes com TEA apresentam alterações imunes como células *natural killer* disfuncionais (Enstrom et al., 2009) e aumento no número de células T, podendo refletir em elevadas concentrações de citocinas no plasma ou soro e no tecido nervoso destes pacientes (Harrison e Pheasant, 1995, Vargas et al., 2005, Li et al., 2009a, Ashwood et al., 2011a). Além disso, a ativação de células microgliais e astrocitárias já foi descrita em algumas regiões cerebrais de pacientes diagnosticados com TEA, como córtex e cerebelo (Vargas et al., 2005). As alterações na resposta inflamatória podem ser observadas em pacientes jovens e adultos (5-44 anos). Em geral, pacientes com TEA apresentam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e concentração reduzida das anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (fator β de transformação do crescimento) no tecido nervoso, LCR, plasma ou soro (Jyonouchi et al., 2001, Vargas et al., 2005, Li et al., 2009a, Ashwood et al., 2011a). Alguns estudos também têm avaliado a capacidade de células monocíticas de pacientes com TEA produzirem citocinas diante de estímulos pró-inflamatórios. Jyonouchi e colaboradores (2014) relataram que células monocíticas de pacientes com sintomas mais severos produzem maior quantidade de citocinas, principalmente IL-1 β e IL-6, quando estimuladas com agonistas para os receptores TLR1, 2, 4, 6, 7 e 8. No entanto, nem todos os estudos apresentam um padrão

consistente quanto a concentração de citocinas, a qual pode variar dependendo do grau de severidade dos sintomas e da associação com outras patologias, por exemplo, comprometimento do trato gastrointestinal, muito comum em pacientes com autismo (Napoli et al., 2013).

Considerando que a resposta inflamatória participa da fisiopatologia do TEA, a mensuração de neopterina pode ser um biomarcador confiável da ativação do sistema imune. Entretanto, poucos estudos investigaram a concentração de neopterina como biomarcador em pacientes com autismo (Messahel et al., 1998, Sweeten et al., 2003, Zimmerman et al., 2005). Alguns estudos já relataram elevadas concentrações de neopterina em urina, plasma e LCR de pacientes diagnosticados com TEA (Harrison e Pheasant, 1995, Messahel et al., 1998, Sweeten et al., 2003), enquanto outros não observaram diferenças na concentração da pteridina em relação a controles sadios (Eto et al., 1992).

Além da elevada concentração de IL-1 β na periferia e SNC em pacientes diagnosticados com TEA, algumas evidências sugerem que a ativação do inflamassoma esteja envolvida na patogênese da doença. Por exemplo, células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticados com TEA apresentam maior expressão genética de caspases, entre elas a caspase-1 dependente do inflamassoma (Siniscalco et al., 2012). Ainda, um estudo recente mostrou que variações genéticas em *Nlrp5*, gene essencial para o desenvolvimento embrionário, estão associadas a síndromes do desenvolvimento, entre elas o autismo (Docherty et al., 2015). Inicialmente, acreditava-se que *Nlrp5* era expresso exclusivamente em oócitos humanos e murinos (Tong et al., 2002, Tong et al., 2004), porém, recentemente mostrou-se que este receptor também é expresso em linhagem de células do endotélio cerebral de humanos (Nagyoszi et al., 2015). Até o momento não se sabe se o receptor NLRP5 é capaz de formar inflamassomas funcionais, mas pode-se sugerir que este receptor exerça alguma função na homeostasia do SNC e esteja relacionado a patogênese do TEA.

Como mencionado anteriormente, a neopterina possui propriedades de potencializador da função cognitiva, anti-inflamatórias e antioxidantes. Desta forma, hipotetizamos que, durante condições inflamatórias, a produção de neopterina no SNC representaria um mecanismo protetor para as células vizinhas a locais onde haja processos com inflamação ativa, seja aguda ou crônica, modulando negativamente a ativação do inflamassoma.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do pré-condicionamento com neopterina sobre a ativação do inflamassoma no SNC em condições inflamatórias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I:

- Investigar a produção e secreção de neopterina em condições de mitotoxicidade induzida por azida sódica em cultura primária de astrócitos murinos;
- Investigar o efeito *in vitro* de neopterina exógena sobre parâmetros de estresse oxidativo em condições de mitotoxicidade em cultura primária de astrócitos murinos;

Capítulo II:

- Investigar a secreção/ produção temporal de neopterina e IL-1 β no soro e hipocampo de camundongos suíços submetidos a neuroinflamação induzida por LPS;
- Investigar a expressão gênica de GTPCH e IL-1 β no hipocampo de camundongos suíços submetidos a neuroinflamação induzida por LPS;

Capítulo III:

- Investigar a concentração de LPS que induz a ativação do inflamassoma através da detecção de caspase-1 ativada no sobrenadante de células de astroglioma C6;
- Investigar o efeito *in vitro* do pré-condicionamento com neopterina exógena sobre a expressão gênica e/ou conteúdo de proteínas constituintes do inflamassoma em cultura primária de astrócitos humanos expostos ao estímulo inflamatório induzido por LPS;
- Investigar o efeito *in vitro* do pré-condicionamento com neopterina exógena sobre a secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em

cultura primária de astrócitos humanos expostos ao estímulo inflamatório induzido por LPS;

- Investigar o efeito *in vitro* do pré-condicionamento com neopterina exógena sobre a expressão gênica de caspase-1 em cultura primária de astrócitos humanos expostos ao estímulo inflamatório induzido por LPS;

Capítulo IV:

- Investigar a concentração plasmática de neopterina e citocinas anti- e pró-inflamatórias em indivíduos diagnosticados com TEA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.1.1. Animais

Foram empregados camundongos albinos suíços machos com 2 meses de vida, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, a 24 ± 1 °C, com acesso livre à água e comida (Nuvital, PR, Brasil). Cabe salientar que durante todos os procedimentos foram seguidos os princípios básicos do uso de animais em toxicologia (adotados pela Sociedade de Toxicologia em Julho de 1989), minimizando o número de animais, bem como seu sofrimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo CEUA N° PP00760).

4.1.2. Indução de inflamação através da administração i.p. de LPS

Os camundongos receberam uma administração i.p. de LPS (*Escherichia coli* LPS; 0,33 mg/kg; serotipo 0127:B8) diluído em solução salina (NaCl 0,9%), e foram eutanasiados por decapitação após 5, 15, 30 ou 60 minutos. Os animais utilizados como controle receberam somente solução salina. A dose de LPS utilizada está de acordo com estudos prévios que mostram a resposta pró-inflamatória no SNC de camundongos adultos (Berg et al., 2004, Henry et al., 2009). Após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado e centrifugado a $3.000 \times g$ por 5 minutos para obtenção do soro. Além disso, o cérebro foi dissecado para a coleta do hipocampo. As amostras foram armazenadas a -80°C. Posteriormente, utilizou-se as amostras de soro para analisar a concentração de neopterina e conteúdo proteico de pró-IL-1 β e IL-1 β . A mensuração de neopterina também foi realizada nas amostras de hipocampo, além da análise da expressão gênica das proteínas GTPCH e pró-IL-1 β e do conteúdo proteico de caspase-1.

4.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.2.1. Cultura primária de astrócitos corticais murinos

As culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir do córtex cerebral de ratos Wistar de 1 – 2 dias de idade, de acordo com Olivera e colaboradores (2008). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo CEUA da Universidade Federal de Santa Catarina

(Protocolo CEUA N° PP00425). Os astrócitos foram semeados em placas de 24 poços (2×10^4 células/cm²) e mantidos em meio de Eagle com modificação de Dubelcco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 3 g/L de HEPES, 100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. A pureza astrocitária foi determinada mediante a quantificação das células GFAP (proteína ácida fibrilar glial) positivas e foi superior a 98%. Quando as células atingiram confluência, os astrócitos foram expostos à azida sódica 5 mM por 3 horas para coleta do sobrenadante e mensuração de neopterina. Ainda, as células foram tratadas com azida e/ou neopterina (50 e 500 nM) por 3 horas para determinação da produção de ERO e lactato e do conteúdo de HO-1.

4.2.2. Manutenção da linhagem celular de astroglioma C6

A linhagem celular de astroglioma C6 foi obtida de *American Type Culture Collection* (Rockville, EUA). Após um determinado número de passagens, estas células adotam características de astrócitos (células 99% GFAP positivas). As células foram semeadas em placas e cultivadas em meio DMEM contendo 2,5 mg/mL de Fungizone® e 100 U/L de gentamicina, suplementadas com 5 % (v/v) de SFB, e mantidas a 37°C com 5 % de CO₂ em ambiente umidificado. Posteriormente, as células foram tratadas com 0,05 % de tripsina em EDTA e semeadas em placas de 24 poços (10×10^3 células/poço). Quando atingiram confluência, as células foram semeadas em placas de petri (10×10^5 células/placa) e tratadas com LPS 1 e 5 µg/mL por 24 horas. Após este período, as células e o sobrenadante celular foram coletados para análise do conteúdo de caspase-1 por *Western blot*.

4.2.3. Cultivos primários de células nervosas humanas

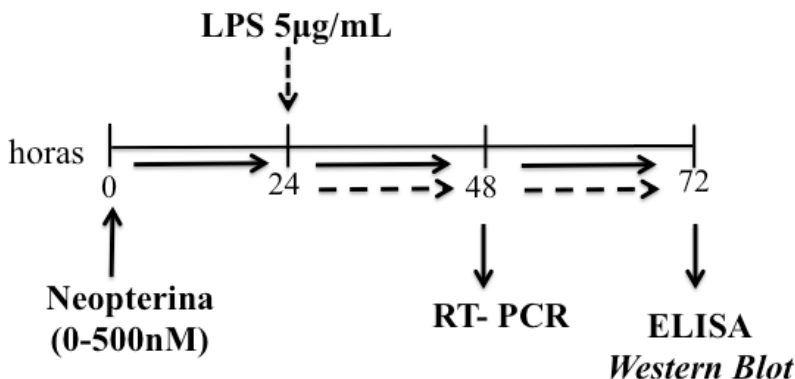
Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroinflamação, coordenado pelo Prof. Gilles Guillemin na *Macquarie University* (MQ, Austrália) durante o doutorado Sanduíche e através de um acordo de Doutorado em Cotutela.

O cultivo primário foi realizado a partir do cérebro de fetos humanos entre 16 e 19 semanas de vida gestacional coletados após terminação terapêutica com consentimento dos pacientes. Tanto a coleta como o processamento das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Humanos (*HREC Application* REF 5201300330) e seguiram as normas do *National Statement on Ethical Conduct in Human Research* (2007) da Austrália. Saliento que a obtenção de células nervosas humanas foi possível por ser legal o término terapêutico da

gestação no estado de *New South Wales*, Austrália, onde a *Macquarie University* está localizada. As culturas primárias foram preparadas usando um protocolo previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Guillemin (Guillemin et al., 2005).

4.2.3.1. Cultura primária de astrócitos

Após a chegada da amostra, o tecido cerebral foi coletado e lavado com tampão fosfato salina (PBS). A suspensão celular foi centrifugada a $500 \times g$ por 5 minutos em temperatura ambiente e o concentrado da mistura de células cerebrais foi utilizado para a preparação dos cultivos. Parte do tecido cerebral foi colocado em 10 mL de meio RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) 1640 contendo 10 % de soro fetal bovino inativado por calor, 2 mM de glutamina, 200 IU/mL de penicilina G, 200 µg/mL de sulfato de estreptomicina, e 0,5 % de glicose. Posteriormente, realizou-se homogeneização com pipetas graduadas de 10, 5 e 2 mL e o cultivo da dispersão celular em frascos de cultura de 75-cm² (Corning, NY). As culturas foram mantidas a 37°C com 5 % de CO₂ em ambiente umidificado. O meio foi substituído após 3 dias, e então a cada 3-4 dias. Após 10-12 dias em cultura, obteve-se uma cultura pura de astrócitos com confluência em torno de 90%. As células foram tratadas com 0,05 % de tripsina em EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e semeadas em placas de 6 poços (10×10^4 células/poço). Primeiramente, as células foram tratadas com LPS 5 µg/mL por 6, 12 e 24 horas. Após, as células foram coletadas e preparadas para análise da expressão gênica das proteínas pró-IL-1β e pró-caspase-1. Em um segundo momento, as células foram pré-condicionadas com neopterina (5-500 nM) por 24 horas e então tratadas com LPS 5 µg/mL, sem remover a neopterina (Esquema 1). Após 24 horas de co-exposição à neopterina e LPS, as células foram coletadas para análise da expressão gênica das proteínas pró-IL-1β e pró-caspase-1. Depois de 48 horas de co-exposição à neopterina e LPS, as células foram coletadas para análise do conteúdo proteico de pró-caspase-1 e ASC e o sobrenadante celular foi coletado para mensuração das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-10 e IL-1Ra.



Esquema 1. Representação esquemática do protocolo experimental *in vitro*. Este protocolo foi utilizado para avaliar os efeitos do pré-condicionamento com neoptertina na ativação do inflamassoma induzido por LPS em cultura primária de células nervosas humanas.

4.2.3.2. Cultura primária de neurônios

A cultura neuronal foi preparada a partir do mesmo tecido cerebral utilizado para a cultura de astrócitos utilizando-se um protocolo adaptado do método de Kerr e colaboradores (1998). As células foram cultivadas em placas de cultura revestidas com Matrigel (diluído 1/20 em Neurobasal) e mantidas em meio Neurobasal suplementado com 1% de suplemento B-27, 1% de Glutamax, e 1% de penicilina/estreptomicina. As culturas celulares foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ em ambiente umidificado. O meio de cultura foi substituído uma vez por semana e a cultura de neurônios foi utilizada em até 14 dias após o início do cultivo (Guillemin et al., 2004). As células foram tratadas da mesma maneira que a cultura primária de astrócitos, como representado no esquema 1, porém as amostras foram utilizadas exclusivamente para análise da expressão gênica da proteína pró-caspase-1.

4.3 AMOSTRAS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM TEA

Estes experimentos também foram realizados no Laboratório de Neuroinflamação, coordenado pelo Prof. Gilles Guillemin na *Macquarie University* (MQ, Austrália) durante o doutorado Sanduiche e através de um acordo de Doutorado em Cotutela.

As amostras de soro sanguíneo foram coletadas na clínica

pediátrica do Hospital Universitário Sultão Qabbos, Omã. Crianças entre 3 e 13 anos de idade saudáveis ou recém-diagnosticadas com TEA foram recrutadas de 15 famílias diferentes, totalizando 27 crianças. Todos os procedimentos seguiram o código de ética da Declaração de Helsinki, elaborada pela Associação Médica Mundial, para experimentos envolvendo seres humanos. Os pais de cada participante concordaram com a coleta das amostras por consentimento escrito, de acordo com as orientações e aprovação do Comitê de Ética da Universidade Sultão Qabbos (EC 158/2010). Os participantes foram inicialmente avaliados e excluídos com base no histórico de condições que pudessem comprometer as análises bioquímicas, por exemplo, doenças genéticas como esclerose tuberosa, doença do X Frágil, fenilcetonúria e síndrome de Lesch-Nyhan; síndrome alcoólica fetal, infecção do ouvido médio e uso materno de drogas ilícitas. Outros dados demográficos estão descritos na tabela 4. Nenhum dos participantes teve mudanças na dieta ou no tratamento antes do início do estudo. O diagnóstico de TEA foi realizado de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (APA, 2000) e confirmado pelo questionário padronizado e validado de Escala de Classificação de Autismo na Infância (CARS). A escala CARS maior que 30 foi usada para confirmar todos os diagnósticos de TEA. Após 12 horas em jejum, as amostras de sangue de ambos os grupos foram coletadas no Hospital Universitário Sultão Qabbos e armazenadas a -80°C até as análises bioquímicas. Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, *Macquarie University*, em conformidade com a aprovação institucional para a utilização de biomateriais humanos (HREC5201300330). Estas análises incluíram a mensuração de neopterin e determinação de citocinas anti-inflamatórias, IL-1Ra e IL-10, e pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Tabela 4. Dados demográficos dos participantes

	Controles saudios	Pacientes com TEA
<i>N</i>	12	15
Gênero (feminino/masculino)	2/10	05/10
Idade (Média \pm EPM)	9,61 \pm 2,9	8,47 \pm 2,36
faixa etária	(4 - 13)	(3 - 10)
Escala de CARS (Média \pm EPM)	17,44 \pm 2,89	36,19 \pm 4,51

Adaptado de Lim et al., 2015.

4.4. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

4.4.1. Análise de neopterina por cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio imunoenzimático

4.4.1.1. *Preparação e análise de amostras do estudo in vivo e in vitro*

As proteínas das amostras de soro de camundongos e sobrenadante da cultura de astrócitos primários murinos foram precipitadas adicionando-se 1 volume (1:1, v/v) de ácido tricloroacético (TCA) 5%. O hipocampo foi homogeneizado em 100 µL da mesma solução (diluição 1:5 (p/v)). As amostras foram centrifugadas a 14.000 × g por 10 minutos a 4°C. Vinte microlitros do sobrenadante foram utilizados para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando cromatógrafo Waters composto por módulo de separação Waters e2695 e detector fluorescente Multi λ Waters 2475 (Alliance, e2695, Waters, Milford, EUA). As análises foram realizadas em coluna de fase reversa (SUPELCOSIL™ LC-18T, com dimensões de 150 x 4,6 mm, 5 µm) utilizando-se como fase móvel tampão fosfato de K⁺ 15 mM pH 6,4 com fluxo de 0,7 mL/minuto. A identificação e quantificação de neopterina foram realizadas por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 350 nm e emissão de 430 nm (Adaptado de de Lucas et al., 2014). O tempo de retenção da neopterina foi de 4,7 minutos em uma corrida com tempo total de 8 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/L para soro e sobrenadante celular e pmol/mg de proteína para tecido.

A concentração sérica de neopterina mensurada por HPLC foi confirmada por ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA) usando kit comercial (IBL international GmbH, Hamburg, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de neopterina foi estimada por interpolação da curva padrão por mensuração colorimétrica a 450 nm em leitor de placa de ELISA (Infinite® 200 PRO TECAN, Männedorf, Suíça). Os resultados foram expressos em nmol/L.

4.4.1.2. *Preparação e análise de amostras do estudo em pacientes diagnosticados com TEA*

As proteínas das amostras de soro de pacientes diagnosticados com TEA foram precipitadas adicionando-se 1 volume (1:1, v/v) de TCA 10 % e filtradas com um filtro de seringa de teflon (0,22 µm) (Merck-Millipore, CA, USA). As amostras foram centrifugadas a 14.000 × g por 10 minutos a 4°C. Vinte microlitros do sobrenadante foram

utilizados para análise por HPLC utilizando cromatógrafo Agilent 1290 composto por módulo de separação G4220A e detector fluorescente G1321B (*Agilent Technologies*, CA, USA). As análises foram realizadas em coluna de fase reversa (Poroshell® C18, com dimensões de 150 x 2,1 mm, 1,8 μ m) utilizando como fase móvel tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,65 com fluxo de 0,75 mL/minuto. A identificação e quantificação de neopterina foram realizadas por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 370 nm e emissão de 438 nm (Adaptado de Lim et al., 2013). O tempo de retenção da neopterina foi de 5 minutos em uma corrida com tempo total de 8 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/L.

4.4.2. Análise das proteínas HO-1, IL-1 β , caspase-1 e ASC por *Western Blot*

4.4.2.1. Preparação e análise de amostras do estudo in vivo e em células C6

O hipocampo foi homogeneizado em 2,5 volumes (1:2,5, p/v) de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, fluoreto de sódio (NaF) 100 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM, ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 2 mM, Triton X- 100 a 1%, glicerol a 10% e coquetel de inibidores de protease [Roche, Mannheim, Alemanha]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 \times g, durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris 100 mM, pH 6,8 contendo EDTA 4 mM e dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8%. Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e adicionou-se o tampão de diluição (Tris 100 mM, com 40% de glicerol e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção 25:100 (v/v), e β -mercaptoetanol (na concentração final de 8%).

As amostras de soro foram diluídas no tampão de diluição citado anteriormente na proporção 1:20 (v/v). Após, adicionou-se β -mercaptoetanol (na concentração final de 8%) e aqueceu-se as amostras a 100°C durante 5 minutos.

As proteínas presentes no sobrenadante de células C6 foram precipitadas pela adição de 1 volume de metanol (1:1, v/v) e 0,25 volumes de clorofórmio (1:0,25, v/v), seguido por homogeneização e centrifugação a 7.000 \times g por 20 minutos. A fase superior foi descartada e 500 μ L de metanol foram adicionados à interfase. Esta mistura foi centrifugada a 7.000 \times g por 20 minutos e o precipitado contendo as

proteínas foi deixado a 55°C para secar. Depois, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão de diluição e β-mercaptoetanol (na concentração final de 8%) e aquecido a 100°C por 5 minutos. O lisado celular foi preparado em tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 a 1% e 50 µL de coquetel de inibidores de protease (Roche, Mannheim, Alemanha). Os sobrenadantes foram obtidos após centrifugação (12.000 × g, 10 min; 4°C). As amostras foram diluídas em tampão de diluição numa proporção 25:100 (25%, v/v) e β-mercaptoetanol (na concentração final de 8%).

Uma alíquota de 50 µg de proteína total ou 10 µL das amostras de soro foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 15% e gel de entrada a 4%. A eletroforese foi realizada com corrente de 40-80 mA e voltagem máxima de 120 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h). As membranas foram coradas com Ponceau S para verificar a eficiência do processo de transferência e para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS; Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As proteínas HO-1 ou caspase-1 ativada (p20) e IL-1β foram detectadas após incubação *overnight* (4°C) com anticorpos específicos diluídos em TBS-T (solução salina tamponada com Tris e Tween; Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) (anti-HO-1: 1:3.000; Santa Cruz Biotech, CA, USA; anti-caspase-1: 1:5.000; *Cell Signalling*; Danvers, USA; anti-IL-1β: 1:1.000; *Cell Signalling*; Danvers, USA). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-IgG de coelho (1:2.000; *Cell Signalling*; Danvers, USA) ou anti-IgG de rato (1:4.000; *Cell Signalling*; Danvers, USA) e os imunocomplexos foram visualizados usando o sistema de detecção por quimioluminescência ECL (*GE Healthcare*, São Paulo, SP, Brazil), de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o software ImageLab[®].

4.4.2.2. *Preparação e análise de amostras do estudo em cultura primária de células humanas*

As células da cultura primária de astrócitos humanos foram coletadas em tampão de lise RIPA contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 a 1% e 50 µL de coquetel de inibidores de protease (Roche, Mannheim, Alemanha). Os sobrenadantes foram obtidos após centrifugação ($12.000 \times g$, 10 min; 4°C). As amostras foram diluídas em *Laemmli buffer* (Bio-Rad; Hercules, USA) numa proporção 25:100 (25%, v/v) e β-mercaptoetanol (na concentração final de 8%). Uma alíquota de 15 µg de proteína foi isolada por eletroforese usando o gel 4-15% Mini-Protean® TGXTM gel (Bio-Rad; Hercules, USA). Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h). As membranas foram coradas com Ponceau S para verificar a eficiência do processo de transferência.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As proteínas pró-caspase-1 (p45) e ASC foram detectadas após incubação *overnight* (4°C) com anticorpos específicos diluídos em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo 1% de BSA (anti-caspase-1: 1:5.000; Abcam; Cambridge, USA; anti-ASC: 1:500; Abcam; Cambridge, USA). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários conjugados à peroxidase anti-IgG de coelho ou anti-IgG de rato (1:10.000; Dako; Glostrup, Denmark) e os imunocomplexos foram visualizados usando o sistema de detecção por quimioluminescência ECL (Bio-Rad; Hercules, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o software ImageLab®.

4.4.3. **Mensuração da produção de ERO através da taxa de oxidação da diclorofluoresceína**

A produção intracelular de ERO foi detectada usando o composto não-fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esterases intracelulares removem o grupo acetato, convertendo DCFH-DA em DCFH, o qual é incorporado pela célula. Esta molécula não fluorescente é oxidada por ERO intracelular a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente. Células de cultura primária de astrócitos corticais foram incubadas com DCFH-DA 10 µM por 30 minutos a 37°C e após

foram lavadas com PBS. Para a captura de imagens, foi utilizado o microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41 e para as fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens *Q-capture Pro* 5.1. A análise foi realizada em 5-8 campos aleatórios e os resultados foram expressos em número de células positivas.

4.4.4. Mensuração da concentração de lactato

A formação e liberação de lactato foram mensuradas no sobrenadante das culturas de astrócitos murinos, através de analisador específico (YSI 2700 STAT, Yellow Springs, Ohio, USA). Os resultados foram expressos em nmol/L.

4.4.5. Determinação de citocinas

A concentração de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-1Ra (antagonista do receptor de IL-1) foi quantificada no sobrenadante celular da cultura primária de astrócitos humanos e no soro de pacientes diagnosticados com TEA e controles saudáveis usando o kit de imunoenensaio baseado em esferas magnéticas (Bio-Rad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da fluorescência foi realizada no sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad, CA, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle ou picogramas/mL.

4.4.6. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) utilizando BSA como padrão.

4.5. PARÂMETROS MOLECULARES

4.5.1. Determinação da expressão gênica das proteínas GTPCH, pró-IL-1 β e pró-caspase-1 por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real

4.5.1.1. Preparação e análise de amostras do estudo in vivo

O RNA total foi isolado a partir de hipocampo de camundongos usando o kit comercial TRI Reagent (Sigma; Saint Louis, USA), como indicado pelo fabricante. A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop, a 260 nm e a 280 nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA, utilizando-se o kit “M-MLV *Reverse Transcriptase*” (Sigma, Saint Louis, USA). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo o tampão da enzima M-MLV transcriptase reversa, 0,1 M DTT, RNase

OUT, Oligodt, 10 mM dNTP e a enzima M-MLV transcriptase reversa (e quantidade de água DEPC suficiente para completar 20 μ L). Os microtubos foram colocados para reação em um Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e 4°C por 10 minutos, seguindo as instruções do manual do produto.

A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) foi realizada utilizando o kit “*SYBR Green PCR Super Mix Universal*” (Invitrogen; Carlsbad, USA), contendo cerca de 10-100 ng de DNA complementar (cDNA), em um volume final de 15 μ L e na presença de 0,3 μ M de *primers* dos tipos *forward* ou *reverse*. As reações foram realizadas num equipamento ABI PRISM 7900HT (*Applied Biosystems*; Foster City, USA), utilizando-se o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 minutos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo β -actina, empregado como padrão (*housekeeping gene*). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e dois controles foram incluídos em todas as análises, usando-se controle negativo da transcriptase reversa e/ou água ao invés de amostra. Os dados foram expressos em conteúdo relativo de mRNA em relação ao grupo controle.

Foram utilizados *primers* específicos para as proteínas GTPCH e pró-IL-1 β conforme descrito na tabela 5. Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando o programa “BLAST” (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, de acordo com os exons específicos para cada proteína.

Tabela 5. Sequência de *primers* utilizados para determinar a expressão gênica de proteínas em amostras de camundongos

Proteínas	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
GTPCH	TGCTTACTCGTCCATTCTGC	CCTTCACAATCACCATCTCG
pró-IL-1 β	GCCCATCTCTGTGACTCAT	AGGCCACAGGTATTTTGTCTG
β -Actina	GCCCTGAGGCTCTTTCCAG	TGCCACAGGATTCCATACCC

4.5.1.2. Preparação e análise de amostras do estudo *in vitro*

Ao término do tratamento da cultura primária de astrócitos e neurônios humanos, o sobrenadante foi descartado e o RNA total foi isolado a partir do lisado celular como indicado pelo fabricante do

produto *RNeasy mini kit* (Qiagen, Valencia, USA). A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop, a 260 nm e a 280 nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se o kit superscript® VILO™ MasterMix (*Invitrogen*; Carlsbad, USA). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo 4 µL do tampão de Mix de reação VILO (5x) e 2 µL de mix da enzima SuperScript (10x) (e quantidade de água DEPC suficiente para completar 20 µL). Os microtubos foram colocados para reação em um Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e 4°C por 10 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -80°C.

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando o kit “*SYBR Green PCR Super Mix Universal*” (*Invitrogen*; Carlsbad, USA), contendo cerca de 5 ng de cDNA, em um volume final de 20 µL e na presença de 0,3 µM de *primers* dos tipos *forward* ou *reverse*. As reações foram realizadas no equipamento ViiA™ 7 (*Life technologies/ Applied Biosystems*, Carlsbad, USA), utilizando o protocolo descrito no tópico anterior, mas ao invés de utilizar-se β-actina como padrão, utilizou-se beta-2 microglobulina (B2M).

Foram utilizados *primers* específicos para as proteínas pró-IL-1β e pró-caspase-1 conforme descrito na tabela 6. Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando o programa “BLAST” (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, de acordo com os exons específicos para cada proteína.

Tabela 6. Sequência de *primers* utilizados para determinar a expressão gênica de proteínas em amostras de cultura primária de células humanas

Proteínas	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Pró-caspase-1	CTCAGGCTCAGAAGGGAATG	CGCTGTACCCAGATTTTGT
Pró-IL-1β	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCTGAGCTGGA
B2M	AGGCTATCCAGCGTACTCCA	CGGCAGGCATACTCATCTTT

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média + erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo *post-hoc* de Tukey ou Dunnett's, quando o *F* foi significativo. Apenas valores significativos de *F* são citados no texto. O teste *t* de *Student* para amostras pareadas ou

independentes foi utilizado para comparar dois grupos pareados ou independentes. A correção de *Welch* foi utilizada com o teste *t* de *Student* para amostras independentes quando as variâncias dos grupos eram diferentes. Diferenças entre os grupos foram considerados significativas quando $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS; versão 16.0 para *Windows*). Os gráficos foram contruídos utilizando-se o software GraphPad Prism 6[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o doutorado foram organizados em quatro capítulos:

Capítulo I: Avaliação da síntese e dos efeitos da neopterina em condições de mitotoxicidade *in vitro*

No artigo de revisão *Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule* publicado na revista *Journal of Psychiatric Research* em dezembro de 2015 (Ghisoni et al., 2015), compilamos dados da literatura que sugerem que a neopterina seria produzida por células do SNC. Nesse mesmo trabalho adicionamos resultados do nosso grupo de pesquisa que suportam essa hipótese. Assim, mostramos que a neopterina é sintetizada e liberada por células gliais em condições de toxicidade mitocondrial. Ainda, mostramos que a neopterina *per se* apresenta propriedades antioxidantes.

Capítulo II: Avaliação da síntese de neopterina e mediadores inflamatórios em condições inflamatórias

Capítulo III: Efeito da neopterina na ativação do inflamassoma em células nervosas

Os resultados apresentados nos capítulos II e III fazem parte do manuscrito “*Neopterin prevents inflammasome activation in human primary astrocytes*” submetido ao periódico científico *Biochemical Journal*, em 5 de fevereiro de 2016.

Capítulo IV: Avaliação da concentração de neopterina e mediadores inflamatórios no soro de indivíduos diagnosticados com transtorno do espectro autista

Os resultados apresentados neste capítulo fazem parte do artigo “*Altered Kynurenine Pathway Metabolism in Autism: Implication for Immune-Induced Glutamatergic Activity*” publicado na revista *Autism Research* em outubro de 2015.

5.1 CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA SÍNTESE E DOS EFEITOS DA NEOPTERINA EM CONDIÇÕES DE MITOTOXICIDADE *IN VITRO*

5.1.1. Avaliação da secreção de neopterina em condições de mitotoxicidade em cultura primária de astrócitos de ratos neonatos

A Figura 10 mostra a quantificação de neopterina no sobrenadante de cultura primária de astrócitos murinos após 3 horas de exposição à azida sódica (5 mM). Pode ser observado que os valores secretados da pteridina atingiram até 35 nmol/L.

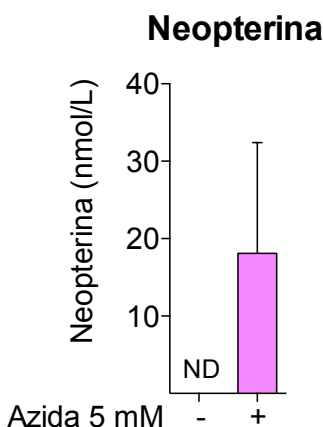


Figura 10. Secreção de neopterina induzida por exposição à azida sódica em cultura primária de astrócitos murinos. A cultura primária de astrócitos de ratos neonatos foi exposta à azida sódica 5mM por 3 horas. O sobrenadante foi coletado e a concentração de neopterina mensurada por HPLC. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes.

Assim, mostrou-se que os astrócitos sintetizam e secretam neopterina em condições de disfunção mitocondrial, corroborando com estudos prévios onde este tipo celular secretou neopterina quando estimulados com IFN- γ (Cano et al., 2008). Portanto, pode-se sugerir que os astrócitos contribuem para a produção central de neopterina.

5.1.2. Avaliação do efeito da neopterina sobre parâmetros de estresse oxidativo em condições de mitotoxicidade em cultura primária de astrócitos de ratos neonatos

A fim de pesquisar as possíveis consequências da secreção astrocitária de neopterina, buscou-se avaliar o efeito desta pteridina em condições de mitotoxicidade em cultura primária de astrócitos murinos. Baseando-se na secreção de neopterina (35 nmol/L) induzida por azida sódica, duas concentrações da pteridina foram utilizadas para avaliação dos efeitos da neopterina *in vitro*, uma similar à quantidade mensurada no sobrenadante celular (50 nM) e uma superior (500 nM), que corresponde à concentração máxima de neopterina detectada em condições patológicas (Blau et al., 1996, Opladen et al., 2012).

A Figura 11A mostra que a exposição à mitotoxina azida sódica (5 mM) aumentou a produção de ERO [$F_{(1,14)}=25,43$; $P<0,001$], enquanto a co-exposição com neopterina (50 e 500 nM) reduziu esse efeito [$F_{(2,14)}=6,30$; $P<0,05$], indicando que a pteridina inibe a produção de ERO induzida por azida sódica. Pode ainda ser observado na Figura 11B que apesar de atenuar a geração de ERO, a neopterina não modificou a ativação da via glicolítica compensatória ao estresse oxidativo induzido por azida sódica, indicado pelas concentrações de lactato. A Figura 11C mostra que a redução do estresse oxidativo acontece em paralelo ao aumento do conteúdo da enzima HO-1. A figura mostra que tanto o tratamento com neopterina [$F_{(2,6)}= 16,45$; $P<0,01$] ou com azida sódica [$F_{(1,6)}= 87,36$; $P<0,001$] aumentaram o conteúdo de HO-1, porém não houve interação significativa entre os tratamentos.

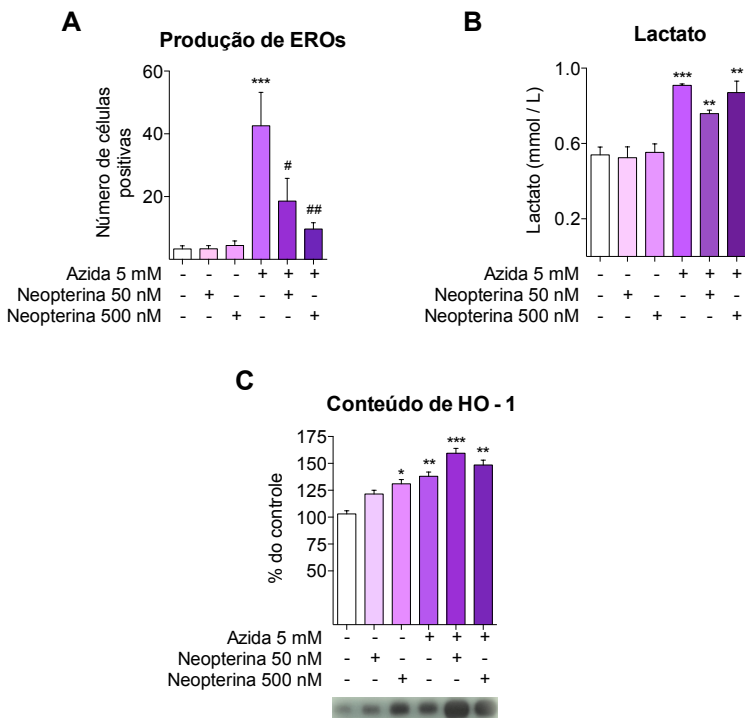


Figura 11. A neopterina modula positivamente o conteúdo de HO-1 e inibe a geração de ERO induzida por azida sódica em cultura primária de astrócitos corticais. A cultura primária de astrócitos de ratos Wistar neonatos foi exposta simultaneamente à azida sódica 5mM e/ou neopterina (50 e 500 nM) por 3 horas. A produção de ERO foi avaliada pela determinação da oxidação do DCF-DA (2'-7'-diclorofluoresceína diacetato) analisando-se o número de células fluorescentes (A). A determinação de lactato foi mensurada no sobrenadante celular utilizando-se o analisador bioquímico YSI 2700 STAT (B). O conteúdo de HO-1 foi analisado por *Western blot* e os dados quantificados por densitometria (C). Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao controle; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ vs. azida sódica 5mM (ANOVA de duas via seguido de *post-hoc* de Tukey).

Os resultados apresentados mostram que a neopterina (50 nM) exerceu papel citoprotetor através da inibição da produção de ERO, mas não atenuou a disfunção mitocondrial, mensurada indiretamente pela produção de lactato, induzida pela mitotoxina azida sódica. Assim, pode-se sugerir que a pteridina atue preferencialmente na modulação da atividade de enzimas antioxidantes como um mecanismo compensatório ao estresse oxidativo, do que na inibição dos complexos da cadeia respiratória mediado pela mitotoxina. Ainda, tanto o tratamento com neopterina como com azida sódica aumentaram a imunoreatividade para a enzima HO-1, marcador da ativação do fator de transcrição Nrf2. Porém, os dois compostos atuaram por mecanismos distintos. No caso do tratamento com azida, o aumento na imunoreatividade para HO-1 foi claramente induzido por estresse oxidativo mitocondrial, evidenciado pelas concentrações elevadas de lactato e ERO, enquanto que a exposição a neopterina apenas induziu o aumento de HO-1. Neste contexto, concentrações aumentadas de HO-1 induzidas por outros compostos altamente hidrofílicos (como a neopterina), por exemplo, resveratrol, acetil-L-carnitina e curcumina também foram associados com proteção contra estresse oxidativo e neurotoxicidade em sistemas experimentais *in vitro* (Calabrese et al., 2005, Gonzalez-Reyes et al., 2013, Quincozes-Santos et al., 2013).

Além de aumentar o conteúdo de HO-1, resultados prévios do nosso grupo também demonstraram que a neopterina *per se* aumenta o conteúdo de Nrf2 em cultura de astroglioma C6 (dados não publicados), fator que ativa a transcrição de genes que codificam proteínas antioxidantes, incluindo HO-1, através de ligação à sequência ARE. A ativação de Nrf2 é sensível ao estado *redox*, portanto, sua ativação depende do grau de estresse oxidativo, a fim de coordenar distintas respostas biológicas para manter a homeostasia celular (Shih et al., 2003). Sabe-se que a ativação de Nrf2 modula positivamente a transcrição de enzimas envolvidas na síntese de GSH, além de GR e GPx (Shih et al., 2003), enzimas cuja atividade foi positivamente modulada pela injeção via i.c.v. de neopterina em camundongos (Ghisoni e Latini, 2015).

Por outro lado, estudos mostraram que a neopterina favorece a indução de estresse oxidativo e inflamação em células de tecidos periféricos expostas a altas concentrações do metabólito. Considerando os valores encontrados em populações de referência, as concentrações usadas nestes trabalhos ultrapassaram em 10 a 100.000 vezes o valor normal e superaram em até 2.000 vezes as usadas neste trabalho. Por exemplo, os valores de referência na população normal variam entre 5 e

8 nmol/L no soro e no LCR (Hagberg et al., 1993, Widner et al., 2002, Casal et al., 2003, Kuehne et al., 2013), enquanto a maioria desses estudos usou concentrações de neopterinina entre 1 e 1000 μ M (Baier-Bitterlich et al., 1995, Schobersberger et al., 1995, Schobersberger et al., 1996, Widner et al., 1998, Hoffmann et al., 1999). De acordo com esses dados e no que se refere ao efeito intracelular da pteridina, existem evidências de que a neopterinina induziria a ativação de NF- κ B em células do músculo liso vascular murino (Hoffmann et al., 1996) e em células endoteliais da artéria coronária humana (Cirillo et al., 2006), e a expressão de NOS2 em células do músculo liso vascular murino contribuindo para a produção de ON e eventual síntese de peroxinitrito (Schobersberger et al., 1995, Widner et al., 1998). Finalmente, a neopterinina também tem sido associada com morte celular programada em linhagem de células monocíticas (Baier-Bitterlich et al., 1995) e de epitélio alveolar murino (Schobersberger et al., 1996) expostas a até 1000 μ M de neopterinina. Estudos sugerem que tanto a neopterinina como ON e ERO produzidos por células imunes ativadas contribuem para a defesa do hospedeiro, criando um ambiente oxidativo a fim de remover patógenos e/ou tecidos lesionados (Huber et al., 1984, Albina et al., 1991, Vaissiere et al., 1999). Assim, baseado nesses resultados contraditórios da literatura, a neopterinina parece apresentar um papel dual, ou seja, concentrações muito elevadas estariam relacionadas com um papel pró-inflamatório, enquanto concentrações ligeiramente acima da secretada em condições pró-inflamatórias, exerceriam um papel neuroprotetor. Esse efeito dual já foi descrito para numerosas biomoléculas, como IL-6 (Li et al., 2009b), IL-1 β (Lampa et al., 2012), dopamina (Filloux e Townsend, 1993), entre outros.

5.2 CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE NEOPTERINA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS

5.2.1. Perfil temporal de síntese de neopterinina e da citocina pró-inflamatória IL-1 β em camundongos suíços adultos submetidos à inflamação induzida por LPS

A Figura 12 mostra uma curva temporal de secreção de neopterinina e IL-1 β no soro de camundongos suíços em resposta a um estímulo clássico de indução de inflamação, a administração sistêmica de LPS (0,33 mg/kg). A concentração de neopterinina aumentou rapidamente no soro atingindo o pico máximo em 15 minutos, e

permanecendo aumentada por pelo menos 60 minutos após o desafio inflamatório (Figura 12A) [$F_{(4,9)}=39,87$; $P<0,001$]. Esses dados foram quantificados por cromatografia líquida e foram complementados por ELISA [$F_{(2,5)}=14,17$; $P<0,01$], como mostrado na Figura 13. A Figura 12B mostra que o conteúdo de pró-IL-1 β aumentou significativamente nos primeiros minutos, atingindo o pico máximo após 5 minutos da exposição à endotoxina [$F_{(4,9)}=22,83$; $P<0,001$], que coincidiu com um aumento de 16% de IL-1 β forma madura (Figura 12C).

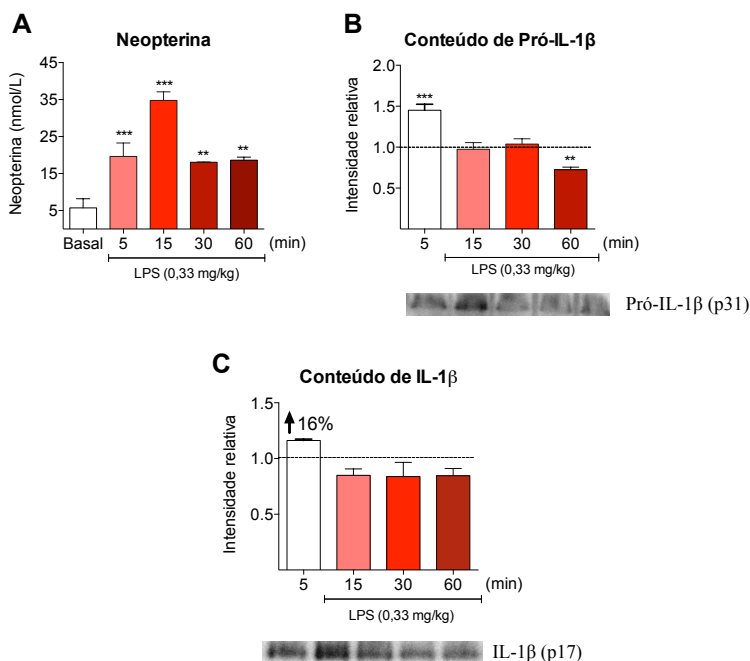


Figura 12. O LPS induz a rápida produção periférica de neopterina e IL-1 β . Camundongos suíços de 60 dias receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg) e, após 5 a 60 minutos, o soro foi coletado para as análises bioquímicas. A concentração de neopterina foi determinada por HPLC (A) e o conteúdo de IL-1 β isoformas pró- (p31) (B) e madura (p17) (C) foram avaliadas por *Western blot* e quantificadas por densitometria. Nos gráficos B e C, a linha tracejada representa os valores do grupo Basal. Mostra-se o valor da média + erro padrão

da média ($n = 5$ animais por grupo). $**P < 0,01$, $***P < 0,001$ comparado ao grupo Basal (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de *Dunnett*).

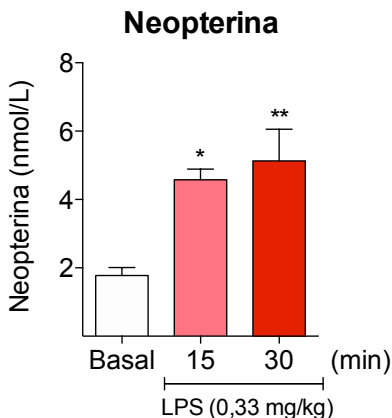


Figura 13. Avaliação da concentração de neopterina sérica em camundongos expostos ao LPS. Camundongos suíços de 60 dias receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg) e, após 5 a 30 minutos, o soro foi coletado para a mensuração da concentração de neopterina por ELISA. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média ($n = 5$ animais por grupo). $*P < 0,05$; $**P < 0,01$ comparado ao grupo Basal (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de *Dunnett*).

Os resultados apresentados mostram que o curso temporal da síntese de neopterina ocorre em paralelo à secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 β na circulação sistêmica. Frente a um estímulo pró-inflamatório, as células Th1 ativadas secretam IFN- γ , que ativa neutrófilos e macrófagos a produzirem uma série de produtos durante o *burst* respiratório, incluindo neopterina, ON e ERO, criando um ambiente oxidativo a fim de remover patógenos e/ou tecidos lesionados (Huber et al., 1984, Albina et al., 1991, Vaissiere et al., 1999).

A mensuração de neopterina nos fluidos biológicos por HPLC tem sido realizada nos últimos 30 anos e é considerado um método sensível e rápido para separação e quantificação desta pteridina (Hausen et al., 1982), representando o método padrão ouro para mensuração de neopterina nos fluidos biológicos. Portanto, a mensuração de neopterina no soro foi inicialmente realizada por HPLC, usando um método desenvolvido por Werner e colaboradores (1987) com pequenas modificações (de Lucas et al., 2014), onde a secreção máxima de

neopterina sérica foi observada 15 minutos após a administração de LPS. Apesar de muito sensível, a determinação de neopterina por HPLC em amostras de soro pode ser problemática devido a presença de outros analitos que podem interferir na especificidade da análise. Assim, a fim de confirmar os resultados obtidos por HPLC, a concentração de neopterina no soro de camundongos também foi analisada por ELISA, um método específico que envolve o uso de anticorpos contra a neopterina. Estudos prévios já validaram a mensuração de neopterina por ELISA em amostras de soro como um método que fornece resultados correspondentes aos obtidos por HPLC (Nagatsu et al., 1984, Ogiwara et al., 1992, Turgan et al., 2001). Neste trabalho, a concentração de neopterina observada pelo método de ELISA foi inferior ao observado por HPLC. Esta diferença pode ser devido ao fato de que as amostras para determinação de neopterina por HPLC foram processadas imediatamente após a coleta, enquanto as amostras utilizadas para o ELISA foram mantidas em freezer -80°C por aproximadamente 4 meses. Apesar dessa diferença, observou-se perfil de aumento semelhante na síntese de neopterina no decorrer do tempo, atingindo o pico máximo em 15 minutos, por ambas metodologias.

Considerando-se que a IL-1 β é uma das primeiras citocinas a serem secretadas em condições inflamatórias sistêmicas (Jiang et al., 1997), esta foi utilizada como parâmetro de comparação à secreção de neopterina. Tanto a secreção de IL-1 β como a de neopterina aumentaram rapidamente no soro, porém, o pico de secreção da pteridina foi observado ligeiramente após o aumento de pró-IL-1 β . A citocina IL-1 β é sintetizada como pró-IL-1 β (p31) e precisa ser clivada proteoliticamente por caspase-1 para formar IL-1 β madura (p17), a qual é posteriormente secretada (Thornberry et al., 1992). A concentração de IL-1 β madura não aumentou significativamente durante o tempo avaliado (60 minutos). Diferente de outras citocinas, a IL-1 β não é secretada através da clássica via que envolve a síntese e processamento no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, respectivamente. O exato mecanismo de secreção da IL-1 β ainda não está totalmente elucidado, mas um dos mecanismos propostos é a formação de microvesículas a partir da membrana plasmática em monócitos e células dendríticas humanas e microglia murina, a qual é induzida pela ativação de P2X₇R. Estas microvesículas contêm pró-IL-1 β , IL-1 β e caspase-1, sugerindo que a liberação da forma madura de IL-1 β predomine sobre a pró-IL-1 β *in vitro* (MacKenzie et al., 2001, Pizzirani et al., 2007). Tanto a formação quanto a liberação das microvesículas da membrana plasmática ocorrem nos primeiros 5 minutos de estimulação com ATP *in*

vitro; porém, a liberação de IL-1 β para o meio extracelular demora em torno de 30 minutos (MacKenzie et al., 2001). Assim, o tênue aumento na secreção de IL-1 β no soro dos camundongos pode ser devido ao pouco tempo de exposição dos animais ao LPS, concordando com estudos prévios onde a concentração máxima de IL-1 β no plasma é observada 4 horas após a administração de LPS via i.p. (0,33 mg/kg) (Godbout et al., 2005, Henry et al., 2008, Henry et al., 2009, Ghisoni et al., 2016).

O aumento na concentração de neopterin e citocinas em plasma ou soro em condições inflamatórias já está documentado na literatura (Maes et al., 2012, Parker et al., 2013). Considerando que estudos recentes sugerem a produção central de neopterin (Kuehne et al., 2013, Ghisoni e Latini, 2015), analisou-se também a síntese de neopterin e pró-IL-1 β no hipocampo de camundongos induzido pela administração sistêmica de LPS.

A Figura 14A mostra o aumento significativo na concentração de neopterin no hipocampo de camundongos 15 minutos após a administração periférica de LPS [$t_{(2)}=7,80$; $P<0,01$]. Pode ser observado também que o aumento de neopterin coincide com o aumento na expressão do gene que codifica para a proteína GTPCH, enzima que controla a formação de neopterin [$t_{(6)}=3,23$; $P<0,01$] (Figura 14B).

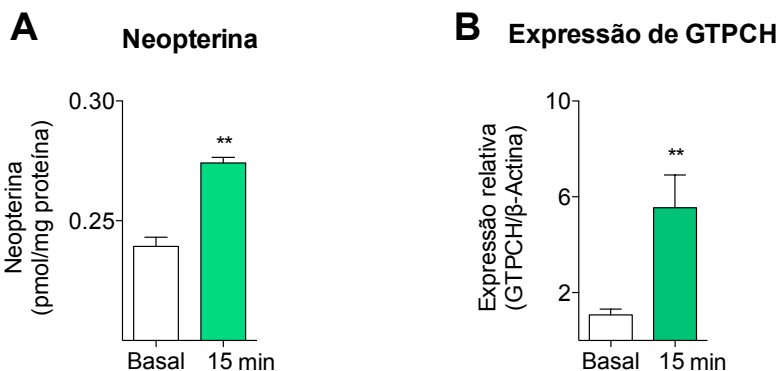


Figura 14. O LPS induz rapidamente a produção hipocampal de neopterin. Camundongos suíços de 60 dias de vida receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg) e, após 5 e 15 minutos, o hipocampo foi coletado para as análises bioquímicas. A concentração de neopterin (A) foi determinada por

HPLC e a expressão gênica do gene que codifica a proteína GTPCH (**B**) por RT-PCR. A expressão gênica é mostrada como a razão entre os valores encontrados para as proteínas de interesse em relação ao gene de referência que codifica para a proteína β -actina. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média ($n = 2-4$ animais por grupo). (**C**) Correlação entre a concentração de neoptertina e a expressão gênica de GTPCH: (●) Basal e (●) 15 minutos. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Basal (Teste t de *Student* para amostras independentes).

Os resultados apresentados mostram a rápida produção de neoptertina e aumento na expressão da enzima GTPCH, sugerindo que a concentração elevada de neoptertina se deve ao aumento na expressão da enzima. Estudos prévios já mostraram o aumento na expressão e no conteúdo de GTPCH no *locus coeruleus* de camundongos após 4 e 6 horas da administração sistêmica de LPS, respectivamente (Kaneko et al., 2001, Kaneko et al., 2003), acompanhada por aumento na produção de BH4 (Kaneko et al., 2001). De acordo com a literatura, a neoptertina produzida periféricamente pode atravessar a BHE e a concentração de pteridina acumulada no LCR reflete as concentrações séricas ou plasmáticas (Fuchs et al., 1989a). Entretanto, a similaridade na produção e secreção temporal de neoptertina na periferia e no hipocampo observadas neste trabalho, não sustentam o mecanismo de difusão simples através da BHE, reforçando a hipótese da produção central de neoptertina independente da produção periférica. Considerando que estímulos inflamatórios sistêmicos modulam positivamente a expressão de GTPCH no tecido cerebral, sem afetar a expressão de PTPS (constitutiva) (Kaneko et al., 2003), pode-se concluir que a síntese de neoptertina está favorecida no SNC em condições inflamatórias.

A Figura 15 mostra a expressão gênica de pró-IL-1 β e o conteúdo de caspase-1 ativada (p20) no hipocampo de camundongos suíços que receberam uma dose i.p. de LPS. As Figuras 15A e B mostram um aumento tanto na expressão da citocina [$F_{(3,4)}=6,88$; $P < 0,05$], como no conteúdo de caspase-1 ativada no hipocampo dos camundongos após 5 a 30 minutos da administração de LPS [$F_{(4,7)}=12,39$; $P < 0,01$], sugerindo a ativação do inflamassoma.

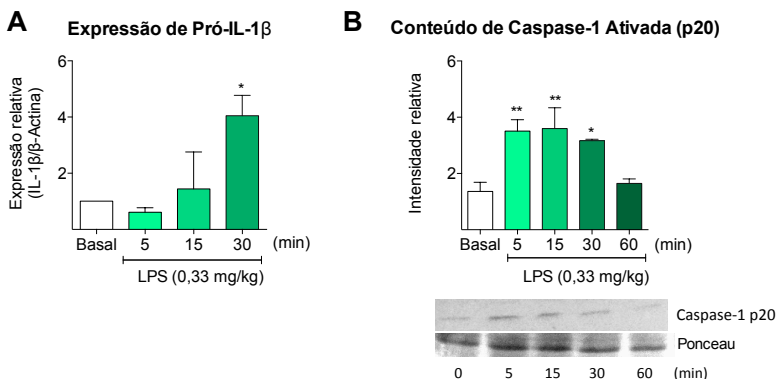


Figura 15. O LPS induz a produção central de IL-1 β com consequente ativação de caspase-1. Camundongos suíços de 60 dias receberam uma única injeção i.p. de LPS (0,33 mg/kg) e, após 5 a 60 minutos, o hipocampo foi coletado para as análises bioquímicas. A expressão gênica de pró-IL-1 β (**A**) foi analisada por RT-PCR e é mostrada como a razão entre os valores encontrados para as proteínas de interesse em relação ao gene de referência que codifica para a proteína β -actina. O conteúdo de caspase-1 ativada (p20) (**B**) foi analisado por *Western blot* e quantificado por densitometria. A coloração por Ponceau foi utilizada como controle da quantidade de proteínas. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média (n = 5 animais por grupo). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado ao grupo Basal (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de *Dunnett*).

Os resultados mostram que o aumento na concentração de neopterina induzido por LPS no hipocampo ocorreu ligeiramente antes do aumento na expressão de pró-IL-1 β e em paralelo à ativação de caspase-1, enzima responsável pela clivagem proteolítica e maturação de pró-IL-1 β . Este trabalho mostrou pela primeira vez que a administração de LPS (0,33 mg/kg) via i.p. induz a ativação de caspase-1, indicador da ativação do inflamassoma, no SNC de camundongos. Outros estudos estão de acordo com estes resultados, mostrando que a administração de LPS induz a ativação de caspase-1 e aumento de NLRP1 no córtex cerebral de camundongos (Kaushal et al., 2015), além de aumentar a secreção de IL-1 β no soro de camundongos via ativação de caspase-1 e NLRP3 (Kayagaki et al., 2011, He et al., 2013b). No entanto, as doses de LPS empregadas por esses autores foram em torno de 15 a 75 vezes

superiores às empregadas neste trabalho (5 – 25 mg/kg). Nossos resultados mostram que o aumento na expressão de pró-IL-1 β ocorreu ligeiramente após a ativação de caspase-1. Esse resultado provavelmente se deve ao fato de pró-IL-1 β não ser o único substrato celular de caspase-1 (Gurcel et al., 2006, Lamkanfi et al., 2008).

Os resultados mostram o aumento na concentração de neopterinina e expressão de GTPCH logo após a ativação de caspase-1. O aumento nas concentrações de neopterinina nos fluidos biológicos tem sido utilizado como biomarcador em doenças metabólicas e/ou neurológicas que cursam com inflamação, como por exemplo diabetes do tipo 2, doença de Parkinson, Alzheimer, entre outras condições neurológicas/neurodegenerativas (Widner et al., 2002, Parker et al., 2013, Grossmann et al., 2015). Entretanto, o papel da produção periférica e/ou central de neopterinina nessas condições é desconhecido. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostram que a administração de neopterinina via i.c.v. melhora a resistência ao estresse celular no córtex cerebral de camundongos sadios (Ghisoni e Latini, 2015) e exerce efeito anti-inflamatório no cérebro de camundongos tratados com LPS (Ghisoni et al., 2016). Ainda, a neopterinina via i.c.v. facilita a aquisição da memória do tipo aversiva e a geração do LTP hipocampal (Ghisoni et al., 2016), que consiste basicamente em um aumento persistente na eficiência sináptica importante para o processo de formação da memória (Abraham et al., 2002). A ativação dos inflamassomas NLRP3 e NLRP1 parecem estar envolvidos em prejuízos cognitivos em modelos experimentais caracterizados por neuroinflamação (Mawhinney et al., 2011, Heneka et al., 2013, Tan et al., 2014). Estudos prévios mostram que tanto a caspase-1 como ASC estão envolvidas no prejuízo cognitivo induzido, respectivamente, por infecção neonatal por *Escherichia coli* seguida por exposição ao LPS na vida adulta, e por mutações nas proteínas precursora de β -amilóide e presenilina 1, mimetizando a doença de Alzheimer em camundongos (Bilbo et al., 2005, Couturier et al., 2016). A ativação do inflamassoma é essencial nas respostas anti-microbianas (Broz et al., 2010, Liu et al., 2012, Hanamsagar et al., 2014); entretanto, o controle da sua ativação é essencial para recuperar a homeostasia celular após uma resposta inflamatória, visto que sua ativação persistente pode desencadear a morte celular por piroptose e consequente degeneração tecidual (Fink e Cookson, 2006). Considerando os efeitos benéficos da neopterinina em relação ao estresse celular, inflamação e memória e que a ativação do inflamassoma ocorre em condições de estresse celular e contribui para a inflamação e prejuízos cognitivos, pode-se hipotetizar que a produção central de

neopterina pode exercer algum papel inibitório na ativação do inflamassoma no SNC.

Assim, pode-se sugerir que a produção de neopterina durante o *burst* respiratório em condições inflamatórias, pode contribuir para o estresse oxidativo em células imunes ajudando a combater a lesão ou patógeno e também exercer efeitos benéficos nas células vizinhas expostas ao estresse, por exemplo, por ativação da via Nrf2/ARE. Portanto, considerando-se os efeitos citoprotetores da neopterina apresentados no capítulo anterior, pode-se sugerir que a produção e secreção de neopterina no SNC em condições pró-inflamatórias podem exercer funções neuroprotetoras, por exemplo, por modulação de sistemas antioxidantes, os quais podem interferir na ativação do inflamassoma.

5.3 CAPÍTULO III: EFEITO DA NEOPTERINA NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS NERVOSAS

Considerando que *i)* a neopterina é produzida por células do SNC, *ii)* modula positivamente sistemas antioxidantes e *iii)* sua síntese é estimulada em condições inflamatórias, procurou-se investigar o papel do pré-condicionamento com neopterina (produzida previamente ao estímulo inflamatório) na ativação do inflamassoma.

5.3.1. Avaliação da ativação do inflamassoma induzido por LPS em linhagem astrocitária C6

Inicialmente, padronizou-se o modelo de ativação do inflamassoma induzida por LPS *in vitro*. Para isso, investigou-se, a concentração mínima da endotoxina requerida para provocar a secreção de caspase-1 ativada no sobrenadante de linhagem de astrócitos murinos (células astrogliais C6). A Figura 16 mostra que apenas LPS 5 µg/mL provocou a liberação de caspase-1 ativada (p20) no sobrenadante de células gliais C6.

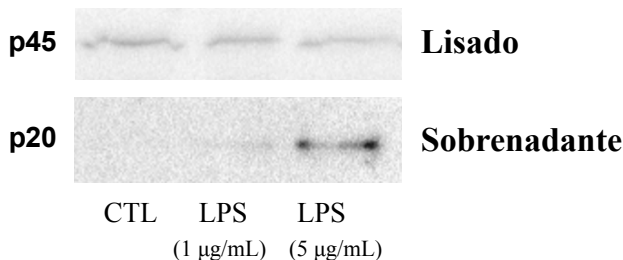


Figura 16. Detecção de caspase-1 ativada (p20) no sobrenadante de astrócitos expostos ao LPS. A linhagem celular de astrócitos de ratos C6 foi exposta ao LPS nas concentrações 1 e 5 µg/mL. Após 24 horas, o lisado celular e o sobrenadante foram coletados e preparados para a determinação do conteúdo de caspase-1, nas formas pró- (p45) e ativada (p20), respectivamente, por *Western blot*. Os dados foram quantificados por densitometria e normalizados por GADPH. Os resultados foram obtidos de três experimentos independentes e é mostrada uma imagem representativa.

5.3.2. Avaliação temporal da expressão de proteínas constituintes do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de astrócitos humanos

As Figuras 17A e B mostram que a mesma concentração de LPS empregada em células C6 (5 µg/mL) induziu significativamente a expressão dos genes que codificam para as proteínas pró-IL-1 β e pró-caspase-1 (pró-IL-1 β : [$F_{(3,4)}=7,912$; $P<0,05$]; pró-caspase-1: [$F_{(3,5)}=32,50$; $P<0,001$]) em cultura primária de astrócitos humanos, atingindo um efeito máximo após 24 horas de exposição.

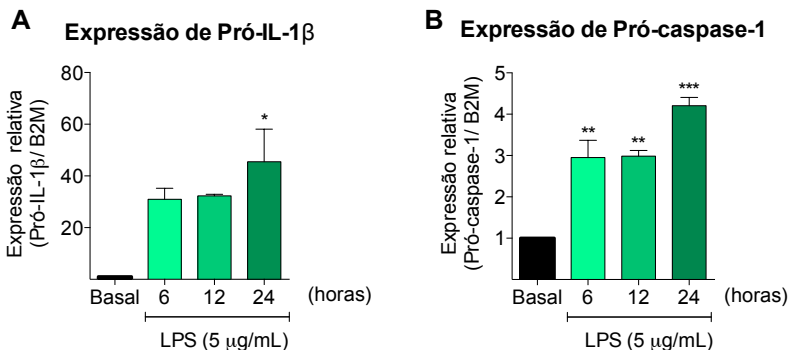


Figura 17. Efeito do LPS sobre a expressão dos genes que codificam pró-IL-1 β e pró-caspase-1 em cultura primária de astrócitos humanos. A cultura celular foi estimulada com LPS (5 μ g/ml) por 6, 12 e 24 horas, o RNA foi purificado e a transcrição de pró-IL-1 β e pró-caspase-1 foram determinadas por RT-PCR. A expressão gênica é mostrada como a razão entre os valores encontrados para as proteínas de interesse em relação ao gene de referência que codifica para a proteína beta-2-microglobulina (B2M). Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Basal (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Dunnett).

5.3.3. Avaliação do efeito da neopterina sobre parâmetros relacionados à ativação do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de astrócitos humanos

As Figuras 18A e B mostram o efeito da neopterina sobre a expressão dos genes que codificam para as proteínas pró-IL-1 β e pró-caspase-1 induzidas por LPS. Pode ser observado que a fase de *primer* da ativação do inflamassoma (aumento na expressão gênica de IL-1 β) não foi significativamente atenuada pela exposição prévia à neopterina 0-500 nM por 24 horas (Esquema 1: desenho experimental em Material e Métodos; página: 69). No entanto, as Figuras 18B-D mostram que o condicionamento com neopterina 50 e/ou 500 nM durante 24 horas prévias à exposição ao LPS inibiu a expressão gênica de pró-caspase-1 e o conteúdo de pró-caspase-1 e ASC em cultura primária de astrócitos humanos (expressão gênica de pró-caspase-1: [$F_{(3,6)}=10,27$; $P < 0,01$]; conteúdo de pró-caspase-1 [$F_{(4,7)}=21,69$; $P < 0,001$], conteúdo de ASC: [$F_{(4,5)}=71,38$; $P < 0,001$]), sugerindo que a neopterina inibe a ativação do inflamassoma.

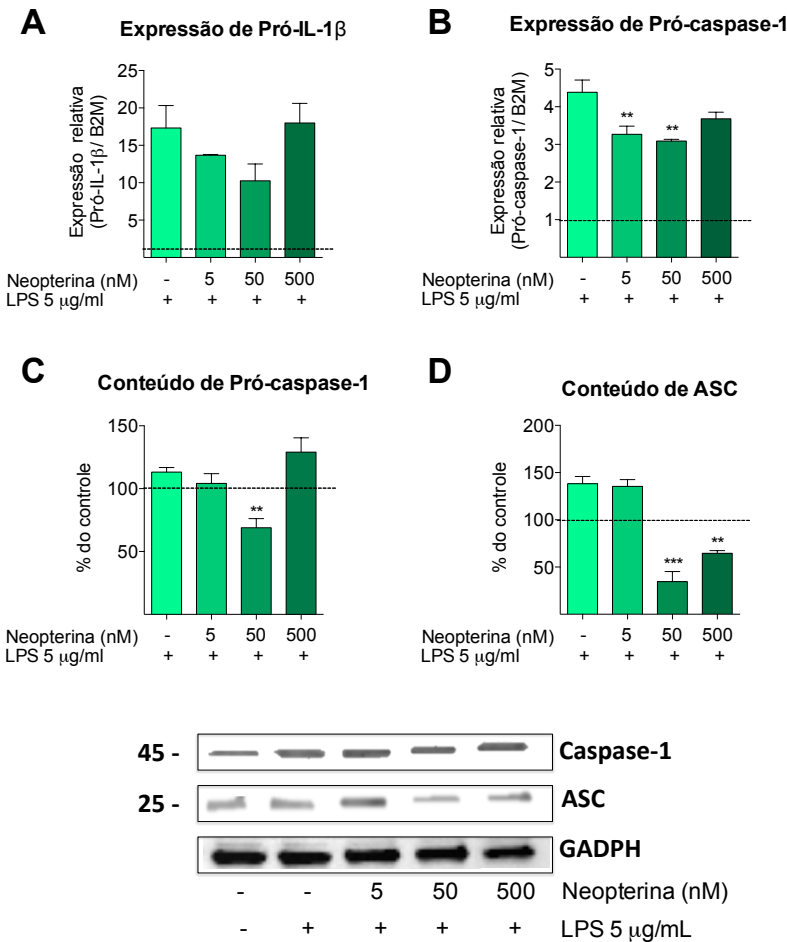


Figura 18. Efeito da neopterin sobre a expressão gênica de pró-IL-1 β e pró-caspase-1 e o conteúdo proteico de pró-caspase-1 e ASC em cultura primária de astrócitos humanos estimulados com LPS. As células foram pré-tratadas com neopterin (0-500 nM) por 24 horas, e posteriormente estimulada com LPS (5 μ g/mL). Após 24 horas da estimulação com LPS, o RNA foi quantificado e a transcrição de pró-IL-1 β (A) e pró-caspase-1 (B) foi determinada por RT-PCR. A expressão gênica está representada como a razão entre os valores encontrados para as proteínas de interesse em relação ao gene de referência que codifica para a proteína B2M. Após 24 horas de exposição à neopterin e seguido por 48

horas de co-exposição à neopterinina e LPS (Esquema 1; Material e Métodos; página 69), as células foram coletadas e o lisado celular preparado para determinação do conteúdo proteico de caspase-1 (C) e ASC (D) utilizando a técnica de *Western blot*. Os dados foram quantificados por densitometria e normalizados por GAPDH. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Dunnett).

Sabe-se que o LPS pode ativar o inflamassoma NLRP3 de maneira convencional, induzindo a secreção de ATP e consequente ativação de P2X₇R (Piccini et al., 2008), ou não-convencional, ativando caspase-11 em camundongos ou os homólogos caspase-4/5 em humanos (Hagar et al., 2013). Independente do tipo de ativação do inflamassoma NLRP3, a proteína ASC é essencial para ativação de caspase-1, que por sua vez é crucial para executar o processamento de pró-IL-1 β e pró-IL-18 (Yamamoto et al., 2004). O aumento no conteúdo de ASC e/ou das formas pró e/ou ativada de caspase-1 no tecido cerebral de humanos já foi mostrado em muitas doenças caracterizadas por aumento nas concentrações de neopterinina, como derrame (Fann et al., 2013), doença de Alzheimer (Heneka et al., 2013, Kaushal et al., 2015) e infecção por HIV (Walsh et al., 2014). Além disso, a expressão de caspase-1 está envolvida na morte de neurônios e astrócitos induzida, respectivamente, por privação de glicose (Zhang et al., 2003) e exposição ao LPS (Alfonso-Loeches et al., 2014). Além do papel na ativação do inflamassoma, a caspase-1 também pode clivar e ativar a caspase-6 em neurônios humanos (Guo et al., 2006), enzima envolvida na clivagem da proteína tau e formação dos emaranhados neurofibrilares intracelulares (Horowitz et al., 2004), características da doença de Alzheimer (Ishino e Otsuki, 1975). Portanto, a inibição do inflamassoma mediada pelo pré-condicionamento com neopterinina em astrócitos humanos mostra-se importante para a homeostasia tecidual em condições patológicas.

Além do conteúdo dos componentes do inflamassoma, também avaliou-se a secreção de IL-1 β , um dos produtos finais da ativação do inflamassoma. A Figura 19A mostram que o pré-condicionamento com neopterinina 50 e 500 nM inibiu significativamente a secreção de IL-1 β , cuja maturação é dependente do inflamassoma [$F_{(3,4)}=23,49$; $P < 0,01$], corroborando com as evidências de que a neopterinina inibe a ativação do inflamassoma.

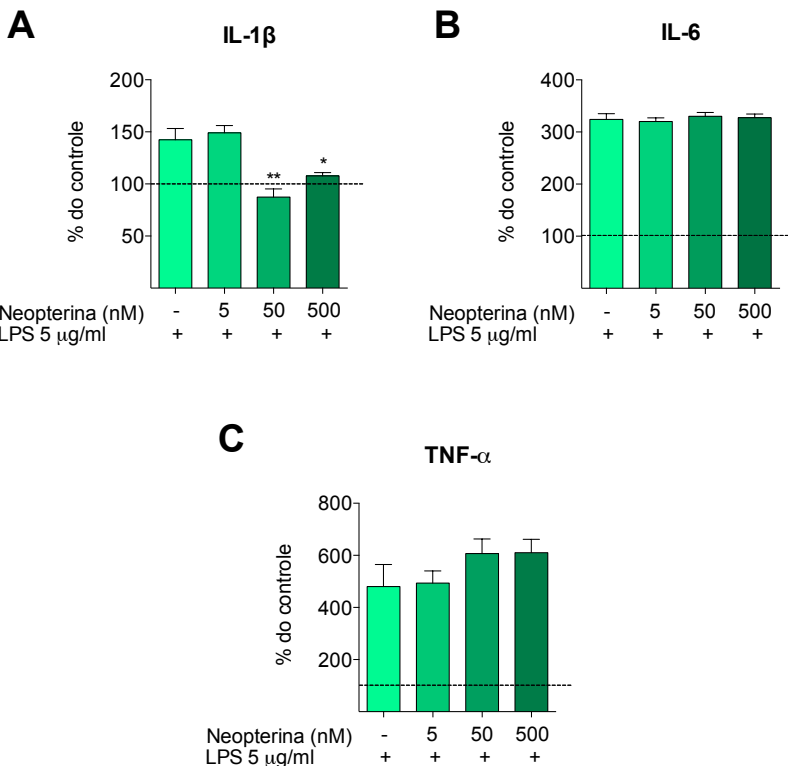


Figura 19. Efeito da neopterina sobre a secreção de citocinas inflamatórias em cultura primária de astrócitos humanos estimulados com LPS. As células foram pré-tratadas com neopterina (0-500 nM) por 24 horas, e posteriormente foram estimuladas com LPS (5 μ g/mL). Após 24 horas de exposição à neopterina e seguido por 48 horas de co-exposição à neopterina e LPS (Esquema 1; Material e Métodos; página 69), o sobrenadante celular foi coletado e a secreção de IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) foi mensurada por kit de ELISA comercial. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de *Dunnett*).

Este efeito também já foi demonstrado para compostos com comprovada atividade antioxidante e anti-inflamatória como resveratrol, curcumina e hemina (Li et al., 2014, Chang et al., 2015, Gong et al., 2015, Li et al., 2015). Assim como a neopterina, a hemina inibe a ativação do inflamassoma NLRP3 induzido por LPS, evidenciado por

redução no conteúdo de NLRP3, ASC e pró-caspase-1 e secreção de IL-1 β , em células da mucosa oral humana (Li et al., 2014). O resveratrol e a curcumina inibem a ativação do inflamassoma NLRP3, evidenciado por redução na ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β , em cultura de macrófagos (Chang et al., 2015, Gong et al., 2015). Ainda, a curcumina também reduz a expressão de TXNIP e inibe a ativação do inflamassoma NLRP3 induzido por glutamato, evidenciado por redução no conteúdo de NLRP3 e caspase-1 ativada e secreção de IL-1 β em fatias hipocâmpais de rato (Li et al., 2015). Como observado, a característica comum entre esses compostos e a neopterina quanto a inibição do inflamassoma é a redução na secreção de IL-1 β , atingindo aproximadamente 90 % e 50 % de inibição, respectivamente.

O inflamassoma apenas processa pró-IL-1 β previamente produzida na célula. A ativação do receptor TLR4 por LPS induz o recrutamento das quinases TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR), MyD88 e IRAK (quinase associada ao receptor de IL-1) e consequente ativação de NF- κ B, o qual encontra-se conjugado com seu inibidor, I κ B (inibidor de proteínas κ B), no citoplasma. A fosforilação de I κ B leva a sua degradação proteossomal e liberação de NF- κ B, que transloca-se para o núcleo, ligando-se a região promotora de genes alvos pró-oxidantes e pró-inflamatórios (DiDonato et al., 1997), ativando a transcrição de quimiocinas e citocinas, a expressão de receptores, moléculas de adesão, entre outros eventos celulares (Vallabhapurapu e Karin, 2009). Dessa maneira, o LPS induz a transcrição das citocinas pró-IL-1 β , TNF- α e IL-6.

Na Figura 19 pode ser observado que o efeito da neopterina foi específico na secreção de IL-1 β , sem afetar a secreção de TNF- α ou IL-6 (independentes da ativação do inflamassoma). Esses dados indicam que a neopterina deve exercer seus efeitos modulando a ativação do inflamassoma ao invés de inibir a ativação de NF- κ B ou a expressão de pró-IL-1 β . A proteína adaptadora ASC é essencial para a atividade de dois tipos de inflamassoma, NLRP3 e AIM2 (Schroder e Tschopp, 2010). O LPS induz a secreção de IL-1 β de maneira dependente da ativação de P2X₇R e/ou da expressão das proteínas ASC e NLRP3 em monócitos e células dendríticas humanas e/ou murinas (Piccini et al., 2008, Netea et al., 2009, He et al., 2013a). Dessa forma, podemos sugerir que a neopterina inibe a ativação do inflamassoma NLRP3.

Ainda, pode-se observar na Figura 20 que o pré-tratamento com neopterina 50 nM levou a um aumento na secreção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1Ra em relação ao grupo LPS (IL-10: [$F_{(3,4)}=7,626$; $P<0,05$]; IL-1Ra: [$F_{(3,4)}=11,09$; $P<0,05$]), favorecendo um

ambiente anti-inflamatório.

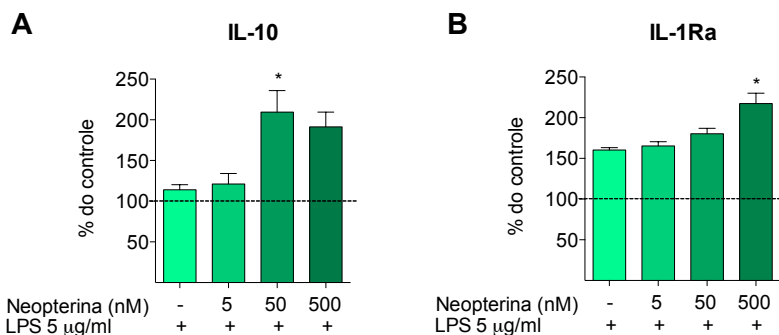


Figura 20. Efeito da neopterina sobre a secreção de citocinas anti-inflamatórias em cultura primária de astrócitos humanos estimulados com LPS. As células foram pré-tratadas com neopterina (0-500 nM) por 24 horas, e posteriormente foram estimuladas com LPS (5 µg/mL). Após 24 horas de exposição à neopterina e seguido por 48 horas de co-exposição à neopterina e LPS (Esquema 1; Material e Métodos; página 69), o sobrenadante celular foi coletado e a secreção de IL-10 (A) e IL-1Ra (B) foi mensurada por kit de ELISA comercial. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ comparado ao grupo LPS (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Dunnett).

Estudos já demonstraram que tanto a IL-10 quanto a IL-1Ra inibem a ativação do inflamassoma *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. A IL-10 inibe a expressão de NLRP3, a ativação de caspase-1 e a secreção de IL-1 β em macrófagos murinos estimulados com LPS+ATP (Gurung et al., 2015), enquanto IL-1Ra comercial (anakinra) reduz a ativação de caspase-1 e expressão de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NLRP3 induzidas pela ingestão crônica de etanol no cerebelo de camundongos (Lippai et al., 2013). A ação anti-inflamatória de IL-10 se dá pela ligação ao seu receptor e consequente ativação de JAK (Janus quinases), as quais fosforilam e ativam as STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição) bloqueando a produção de TNF- α , IL-1, IL-6, entre outras (Lai et al., 1996). IL-10 também reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias em cultura de microglia murina (Lodge and Sriram, 1996) e inibe a morte neuronal *in vitro* (Zhu et al., 2016), provavelmente através da inibição da ativação de NF- κ B e das MAPK.

(proteínas quinase ativadas por mitógeno) mediada por LPS (Wang et al., 1995, Kontoyiannis et al., 2001). IL-1Ra possui três isoformas intracelulares, liberadas durante a morte celular, e uma isoforma solúvel (sIL-1Ra), que pode ser secretada. Todas as isoformas funcionam como antagonistas competitivos que se ligam ao receptor de IL-1, sem induzir a transdução de sinal, inibindo assim a ligação de IL-1 β e IL-1 α (Malyak et al., 1998). As propriedades inibitórias de sIL-1Ra já foram utilizadas para o desenvolvimento de fármacos, como anakinra, usado em pacientes com artrite reumatóide e doenças auto-inflamatórias, como CAPS, onde há ativação exacerbada do inflamassoma (Kone-Paut e Galeotti, 2014). Experimentalmente, anakinra atenua a inflamação induzida pela ingestão crônica de álcool, reduzindo a expressão de citocinas e a atividade de caspase-1 dependente de NLRP3 no cerebelo de camundongos (Lippai et al., 2013). Ainda, IL-1Ra também reduz o número de células microgliais ativadas e o dano neuronal induzido pela excitotoxicidade mediada por NMDA (N-metil-D-aspartato) em cultura organotípica de hipocampo de ratos neonatos (Vogt et al., 2008), além de inibir a ativação de caspase-3 no cérebro de ratos neonatos induzida pela administração intracerebral de LPS (Cai et al., 2003). Portanto, a indução da secreção dessas citocinas anti-inflamatórias estão provavelmente relacionadas às propriedades citoprotetoras e anti-inflamatórias da neopterinina.

A indução da via Nrf-2/ARE e a consequente inibição da produção de ERO também devem contribuir para os efeitos protetores da neopterinina. Todos os ativadores de NLRP3 conhecidos ativam a geração de ERO, incluindo concentrações elevadas de ATP extracelular, colesterol, glicose, peptídeo β -amilóide, LDL oxidada ou ativadores particulados, como asbesto e sílica (Petrilli et al., 2007, Halle et al., 2008, Dostert et al., 2009, Duewell et al., 2010, Estruch et al., 2015). O mecanismo pelo qual as EROs induzem a ativação de NLRP3 ainda não está totalmente elucidado, mas a maioria dos estudos sugere que seja via TXNIP. Esta proteína encontra-se ligada e inibida por TRX1 no citosol, a qual pode ser oxidada por ERO, desfazendo a associação entre as proteínas e liberando TXNIP para ativar o receptor NLRP3, levando a formação do inflamassoma (Zhou et al., 2010). Uma das respostas celulares ao estresse oxidativo é a ativação do fator de transcrição Nrf2, entretanto, o seu papel na ativação do inflamassoma ainda é ambíguo. De acordo com Zhao e colaboradores (2014), o Nrf2 é essencial para a ativação dos inflamassomas NLRP3 e AIM2 em macrófagos murinos e para a inflamação induzida por peritonite em camundongos. Porém, outros trabalhos mostram que compostos que ativam Nrf2 inibem a

ativação do inflamassoma. Por exemplo, os compostos bioativos do chá verde e da planta medicinal chinesa *Litsea cubeba*, respectivamente, epigallocatequina-3-galato e citral, ativam Nrf2 e inibem a ativação do inflamassoma NLRP3 induzido por nefrite lúpica no tecido renal de camundongos (Tsai et al., 2011, Ka et al., 2015). Ainda, a inibição/atenuação da ativação do inflamassoma NLRP3 já foi descrita para vários antioxidantes e/ou indutores da enzima HO-1, incluindo ebselen, resveratrol, curcumina e hemina (Jabaut et al., 2013, Chang et al., 2014, Li et al., 2014, Gong et al., 2015). Além disso, estudos prévios já mostraram que HO-1 induz a expressão de IL-10 e IL-1Ra no fígado de camundongos e em linhagem de hepatócitos e macrófagos de maneira dependente de Nrf2 (Piantadosi et al., 2011). A indução de HO-1 por hemina também induz a secreção de IL-10 e previne o estresse oxidativo no hipocampo de camundongos induzido por transplante hepático (Wang et al., 2015). Portanto, a ativação da via Nrf-2/ARE deve ser um dos mecanismos pelo qual a neopterina aumenta a resistência ao estresse oxidativo no cérebro de camundongos (Ghisoni e Latini, 2015), o conteúdo de HO-1 e a secreção de citocinas anti-inflamatórias, e inibe a geração de ERO induzida por azida e a ativação do inflamassoma induzida por LPS em cultura de astrócitos.

Os resultados mostrados neste capítulo mostram que o pré-condicionamento com neopterina inibe a ativação do inflamassoma NLRP3 induzida por LPS, sendo os efeitos da pteridina mais acentuados na concentração de 50 nM em todos os parâmetros analisados. Essa concentração está ligeiramente acima da detectada no sobrenadante da cultura primária de astrócitos em condições de mitotoxicidade (35 nmol/L) e da concentração que a neopterina atinge no LCR de camundongos quando administrada via i.c.v. (15 nmol/L) (Ghisoni e Latini, 2015, Ghisoni et al., 2016). Portanto, pode-se sugerir que os efeitos citoprotetores e cognitivos da neopterina podem estar relacionados à inibição da ativação do inflamassoma. Ainda, baseando-se no fato da produção de ERO ser um evento crítico na ativação do inflamassoma NLRP3, o mecanismo sugerido para a inibição mediada por neopterina é a ativação da via Nrf2/HO-1 envolvida na redução de estresse oxidativo e produção de IL-10 e IL-1Ra.

A ativação de Nrf2 está estritamente relacionada à ativação do fator de transcrição NF- κ B, o qual modula a produção de citocinas e quimiocinas, a expressão de receptores e moléculas de adesão, entre outros eventos celulares importantes para a resposta inflamatória (Vallabhapurapu e Karin, 2009). A fim de responder efetivamente à inflamação aguda, o NF- κ B também induz o aumento da atividade

mitocondrial e a expressão de NADPH oxidases, as principais fontes de ERO endógena (Manea et al., 2007, Mauro et al., 2011). Ainda, estudos demonstram que a subunidade canônica de NF- κ B, p65, induz o aumento no conteúdo de Keap1, proteína que sinaliza a degradação de Nrf2 via proteassoma (Yu et al., 2011). Em contrapartida, a região promotora do gene *Nrf2* contém vários locais de ligação de κ B, sugerindo que o NF- κ B pode ativar a transcrição de Nrf2 (Rushworth et al., 2012), que por sua vez ativa a transcrição de enzimas antioxidantes e reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios (Itoh et al., 1997, Lin et al., 2008). Portanto, a atividade coordenada de ambos Nrf2 e NF- κ B é essencial para a resolução do estado inflamatório e manutenção da homeostase.

5.3.4. Avaliação do efeito da neopterina sobre parâmetros relacionados à ativação do inflamassoma induzida por LPS em cultura primária de neurônios humanos

A fim de investigar se a neopterina exerceria os mesmos efeitos em outros tipos de células nervosas, analisou-se a expressão gênica de pró-caspase-1 em neurônios. Na Figura 21, pode-se observar que o pré-condicionamento com neopterina nas concentrações de 50 e 500 nM também inibiu o aumento na expressão de pró-caspase-1 [$F_{(3,5)}=7,902$; $P<0,05$] em cultura primária de neurônios humanos, sugerindo que o condicionamento com neopterina inibe a ativação do inflamassoma como um mecanismo genérico e não se restringe a um único tipo celular.

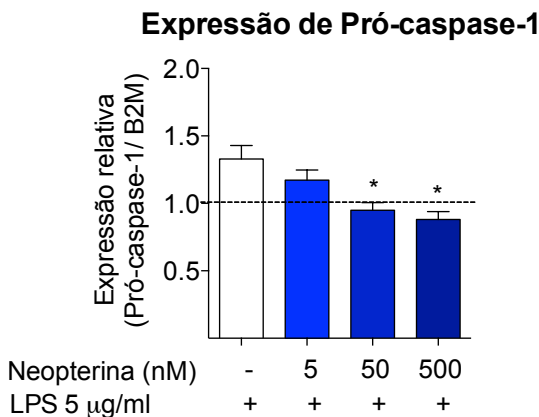


Figura 21. Efeito da neopterina sobre a expressão gênica de pró-caspase-1 em cultura primária de neurônios humanos estimulados com LPS. As células foram pré-tratadas com neopterina (0-500 nM) por 24 horas, e posteriormente estimulada com LPS (5 µg/mL). Após 24 horas de exposição à neopterina e seguido por 48 horas de co-exposição à neopterina e LPS (Esquema 1; Material e Métodos; página 69), o RNA foi quantificado e a transcrição de pró-caspase-1 foi determinada por RT-PCR. A expressão gênica está representada como a razão entre os valores encontrados para as proteínas de interesse em relação ao gene de referência que codifica para a proteína B2M. Mostra-se o valor da média + erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ comparado com o grupo LPS (ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de *Dunnett*).

5.4. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NEOPTERINA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO SORO DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM TEA

Após observar que no modelo de inflamação aguda induzida por LPS a produção temporal de neopterina é similar à secreção da citocina pró-inflamatória IL-1 β , analisou-se a concentração de neopterina e de mediadores anti e pró-inflamatórios no soro de crianças diagnosticadas com TEA. A Figura 22 mostra que indivíduos diagnosticados com TEA entre 3 e 10 anos de idade apresentaram concentrações séricas elevadas de neopterina em comparação a indivíduos saudáveis, atingindo aproximadamente 35 nM [$t_{(14,83)}=2,45$; $P < 0,05$].

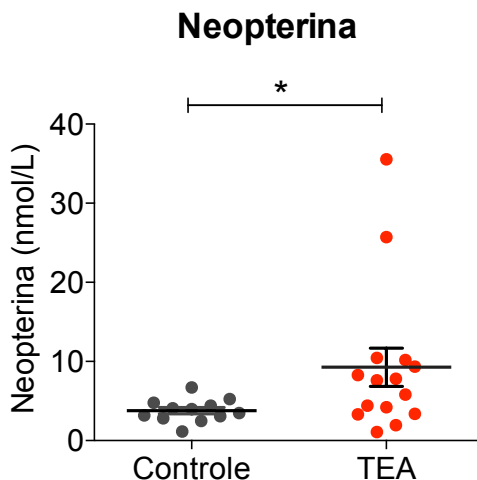


Figura 22: Indivíduos diagnosticados com TEA apresentam concentrações elevadas de neopterina. A concentração de neopterina foi mensurada em amostras de soro de indivíduos com TEA (•) e controles saudáveis (•) por HPLC. Mostra-se o valor da média \pm erro padrão da média de controles sadios ($n=12$) e indivíduos autistas ($n=15$). * $P<0,05$ comparado aos controles (Teste *t* de *Student* para amostras independentes com correção de *Welch*).

O aumento de neopterina pode ser atribuído à ativação de células imunes e consequente secreção de citocinas como IFN- γ e IL-1 β , capazes de induzir a expressão e atividade da enzima GTPCH (Huber et al., 1984, Franscini et al., 2003). Existem poucos trabalhos na literatura sobre a mensuração de neopterina nos fluidos biológicos de pacientes com TEA. Sweeten e colaboradores (2003) também descreveram concentrações elevadas de neopterina no plasma em pacientes com TEA de aproximadamente 6 anos de idade (até 14 nmol/L), porém muito inferiores às observadas neste trabalho, o que pode ser explicado pela metodologia utilizada. No trabalho citado a determinação de neopterina foi realizada por ELISA, enquanto nós utilizamos a metodologia por HPLC. Ainda, outros estudos não observaram diferenças entre pacientes e controles (Eto et al., 1992). Ainda, a análise de neopterina no LCR de indivíduos com a mesma faixa etária mostrou concentrações menores da pteridina nos pacientes com TEA (até 12 nmol/L) em relação à pacientes diagnosticados com outras doenças do SNC (até 35 nmol/L), como dores

de cabeça, atraso no desenvolvimento, entre outras (Zimmerman et al., 2005). Considerando que os controles utilizados não eram saudáveis, e que a concentração de referência para neopterinina no LCR é de 5 nmol/L (Kuehne et al., 2013), pode-se concluir que as concentrações de neopterinina no LCR de pacientes com autismo estavam elevadas. Por outro lado, todos os estudos realizados em urina relataram concentrações aumentadas de neopterinina em pacientes em relação a irmãos e/ou controles sadios (Harrison e Pheasant, 1995, Messahel et al., 1998). Portanto, nosso trabalho é um dos primeiros estudos a detectar concentrações elevadas de neopterinina no soro de pacientes diagnosticados com TEA.

Além da síntese de neopterinina, o IFN- γ produzido em condições inflamatórias, também induz a atividade de IDO-1, que catalisa o uso de triptofano na via das quinureninas (Carlin et al., 1989). Os produtos dessa via apresentam atividades potencialmente neurotóxicas, como o ácido quinolínico (Lehmann et al., 1983), ou neuroprotetoras, como os ácidos quinurênico e picolínico (Ganong et al., 1983). Além dos resultados apresentados nessa tese, Lim e colaboradores (2015) também observaram elevadas concentrações de ácido quinolínico e reduzidas concentrações de ácido picolínico no soro de pacientes TEA (Lim et al., 2015), sugerindo que tanto a síntese de neopterinina como a via das quinureninas podem estar envolvidas na patogênese do TEA.

O aumento da razão quinurenina/triptofano expressa o metabolismo do triptofano, um aminoácido essencial para a biossíntese de serotonina e melatonina, pela via das quinureninas. Portanto, a redução na concentração de triptofano pode levar a alterações na síntese serotoninérgica tornando-se um possível fator contribuidor para alterações do desenvolvimento. De fato, a concentração de serotonina e melatonina no soro de pacientes com TEA é inferior à observada em controles sadios (Makkonen et al., 2008), e a depleção de triptofano da dieta exacerba os sintomas de autismo (McDougle et al., 1996).

Além disso, a redução na concentração de ácido picolínico sugere um desequilíbrio na via das quinureninas, onde a síntese de ácido quinolínico está favorecida. O aumento na concentração de ácido quinolínico no SNC, um agonista de receptores NMDA capaz de induzir vias de sinalização de maneira semelhante ao glutamato (Stone, 1993), pode alterar o equilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória. Estudos sugerem que indivíduos com TEA possuem conexões corticais hiperexcitadas devido ao desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória, mediada por glutamato, e inibitória, mediada por ácido γ -aminobutírico (GABA), o que resulta em alterações na linguagem e

comportamentos sociais em pacientes com TEA (Rubenstein e Merzenich, 2003). De fato, esses indivíduos apresentam concentrações elevadas de glutamato no soro (Shinohe et al., 2006) e em regiões cerebrais relacionadas ao aprendizado, linguagem e comportamento social, como o complexo hipocampo-amígdala e córtex auditivo (Brown et al., 2013), além de redução no conteúdo de subunidades de receptores GABA no córtex frontal (Fatemi et al., 2009). Ainda, pacientes com TEA apresentam maior susceptibilidade às crises epiléticas, uma das consequências de lesões intrahipocampus induzidas por ácido quinolínico em animais (Schwarcz et al., 1984). Portanto, o aumento de ácido quinolínico produzido na via das quinureninas pode agir como uma excitotoxina exógena que contribui na patogênese do TEA, especialmente durante a neuroinflamação. Além dos potenciais efeitos anti-inflamatórios da neopterina mostrados nesse trabalho, um estudo recente demonstrou que a neopterina exógena também inibe a atividade de IDO-1 em células mononucleares humanas (Schroecksnadel et al., 2013), sugerindo que a síntese de neopterina pode exercer funções regulatórias na resposta imune, como a inibição da produção e consequentemente dos efeitos deletérios de metabólitos da via das quinureninas.

A Figura 23 mostra que indivíduos diagnosticados com TEA apresentam concentrações séricas aumentadas das citocinas anti-inflamatórias, IL-1Ra e IL-10 (IL-1Ra: $t_{(18,36)}=2,3$; $P<0,05$; IL-10: $t_{(16,15)}=2,33$; $P<0,05$), enquanto observou-se uma tendência ao aumento na concentração das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a qual não foi significativa.

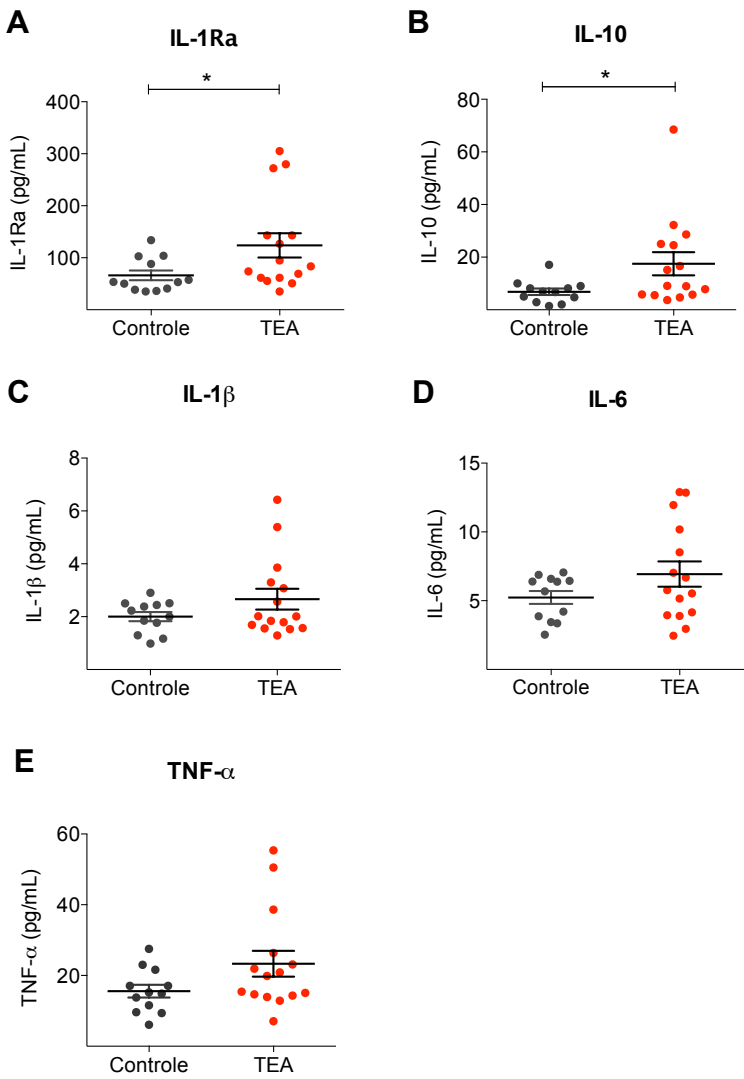


Figura 23: Indivíduos diagnosticados com TEA apresentam concentrações aumentadas de citocinas anti-inflamatórias. As citocinas anti-inflamatórias IL-1Ra (A) e IL-10 (B) e as pró-inflamatórias IL-1 β (C), IL-6 (D) e TNF- α (E) foram mensuradas em amostras de soro de indivíduos com TEA (•) e controles saudáveis (•) por ELISA. Os dados foram expressos em picograma/mililitro (pg/mL) com linhas horizontais representando os valores médios. Mostra-se o valor da média \pm erro padrão da média de controles saudáveis ($n=12$) e

indivíduos afetados por TEA ($n=15$). $*P<0,05$ comparado aos controles (Teste t de *Student* para amostras independentes com correção de *Welch*).

Estudos sugerem que pacientes diagnosticados com TEA apresentam um desequilíbrio na produção de componentes inflamatórios, com predomínio de citocinas pró-inflamatórias (Jyonouchi et al., 2001, Ashwood et al., 2011a). Pacientes diagnosticados com TEA apresentam aumento de IL-6, IL-1 β e/ou TNF- α plasmáticas em comparação a controles sadios ou com atraso no desenvolvimento, sem alterações na concentração de IL-10 (Jyonouchi et al., 2001, Ashwood et al., 2011a). Interessantemente, crianças que exibiram sintomas de TEA tardiamente apresentam concentrações significativamente superiores de IL-1 β em relação à crianças que apresentaram comportamento autista desde a infância (Ashwood et al., 2011a). Ainda, estudos já demonstraram expressão elevada de caspase-1 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes TEA (Siniscalco et al., 2012), sugerindo o envolvimento do inflamassoma na patogênese da doença. Além disso, pacientes com TEA (5-44 anos) apresentam ativação de células microgliais e astrocitárias no tecido cerebral e maior expressão gênica de IL-6 e IL-10 no giro cingulado anterior, e concentração de IFN- γ no LCR (Vargas et al., 2005). Concentrações elevadas de IL-6 e TNF- α também foram detectadas no córtex cerebral de pacientes diagnosticados com TEA em relação a outros pacientes e a indivíduos controle (Li et al., 2009a); mostrando a heterogeneidade da resposta inflamatória nestes pacientes. A diferença no perfil de produção de mediadores anti- e pró-inflamatórios entre estudos é considerada comum, visto que a concentração desses pode variar dependendo do tipo de TEA e da associação com outras patologias, por exemplo, comprometimento do trato gastrointestinal, muito comum em pacientes com autismo (Napolioni et al., 2013).

O aumento de neopterin, IL-10 e IL-1Ra observado nos resultados apresentados pode estar modulando negativamente a produção de IL-1 β , TNF- α e IL-6. Outros estudos já demonstraram concentrações elevadas de IL-1Ra no plasma de pacientes com TEA (Zimmerman et al., 2005), sugerindo que essa pode representar uma contra-resposta a inflamação crônica (Suzuki et al., 2011). Ainda, o perfil de produção de citocinas anti- e pró-inflamatórias parece estar associado, respectivamente, a menor ou maior intensidade dos comportamentos característicos de autismo. Por exemplo, estudos mostram que as células de pacientes diagnosticados com TEA produzem maior quantidade de IL-10, IFN- γ e TNF- α do que células de controles

sadios frente a estímulos pró-inflamatórios. Ainda, pacientes com uma maior produção de IL-10 apresentam melhor desenvolvimento cognitivo, evidenciado por aprimoramento da comunicação oral. Enquanto que pacientes com maior produção de IFN- γ e TNF- α apresentam comportamento estereotipado mais intenso determinado pelo método de Entrevista para Diagnóstico de Autismo - Revisada (ADI-R) (Ashwood et al., 2011b).

Os resultados apresentados nesse capítulo mostram que pacientes diagnosticados com TEA apresentam concentrações sérica aumentadas de neopterina e de citocinas anti-inflamatórias, que podem estar relacionadas a uma contra-resposta ou melhora da resposta inflamatória frente ao estresse celular mediado pela neopterina.

6. CONCLUSÕES

A neopterinina tem sido utilizada como um biomarcador em patologias periféricas e do SNC pelos últimos 40 anos, sendo considerada um produto inerte de excreção da via *de novo* da BH4. Neste trabalho mostrou-se que os astrócitos contribuem para a síntese de neopterinina no SNC e que esta exerce efeitos citoprotetores diante de estresse celular induzido por mitotoxicidade. Ainda, foi possível verificar que condições inflamatórias levam à rápida produção periférica e central de neopterinina, em paralelo à ativação do inflamassoma no hipocampo.

Além de biomarcador da ativação do sistema imune, a produção de neopterinina deve ser uma contra-resposta à inflamação, reduzindo a produção de ERO e aumentando o conteúdo de Nrf2, e consequentemente de HO-1. Assim, a modulação de sistemas antioxidantes pode ser o mecanismo pelo qual a neopterinina inibe a ativação do inflamassoma em células nervosas. Considerando que os astrócitos são células nervosas residentes que desempenham um papel crucial na formação e função sináptica, e na morte e sobrevivência neuronal, controlar a produção astrocitária de citocinas pode ser uma ferramenta importante em condições neuroinflamatórias. Ainda, mostrou-se que pacientes diagnosticados com TEA apresentam concentrações elevadas de neopterinina e citocinas anti-inflamatórias no soro, o que estaria de acordo com uma contra-resposta à inflamação. Considerando-se que a neopterinina inibiu a ativação do inflamassoma e aumentou a concentração de citocinas anti-inflamatórias *in vitro*, pode-se sugerir que a produção de neopterinina em condições inflamatórias crônicas, como o autismo, também pode exercer um efeito neuroprotetor.

7. PERSPECTIVAS

- Confirmar que o pré-condicionamento com neopterina inibe a ativação do inflamassoma induzido por LPS via Nrf2/ARE, investigando se a neopterina inibe a ativação do inflamassoma na presença do inibidor da translocação de Nrf2, trigonelina, em cultura de astrócitos.
- Investigar a ativação do inflamassoma NLRP3 em cultura de células mononucleares isoladas de sangue periférico de pacientes diagnosticados com TEA, analisando o conteúdo de NLRP3, ASC, caspase-1 e secreção de IL-1 β .

REFERÊNCIAS

- Abraham WC, Logan B, Greenwood JM, Dragunow M (2002) Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22:9626-9634.
- Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, Lachmann HJ, Bybee A, Gaudet R, Woo P, Feighery C, Cotter FE, Thome M, Hitman GA, Tschopp J, McDermott MF (2002) Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis and rheumatism* 46:2445-2452.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J (2004) NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20:319-325.
- Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, Stein L, Russo R, Goldsmith D, Dent P, Rosenberg HF, Austin F, Remmers EF, Balow JE, Jr., Rosenzweig S, Komarow H, Shoham NG, Wood G, Jones J, Mangra N, Carrero H, Adams BS, Moore TL, Schikler K, Hoffman H, Lovell DJ, Lipnick R, Barron K, O'Shea JJ, Kastner DL, Goldbach-Mansky R (2002) De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis and rheumatism* 46:3340-3348.
- Albina JE, Abate JA, Henry WL, Jr. (1991) Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN- γ in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *Journal of immunology* 147:144-148.
- Alfonso-Loeches S, Urena-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C (2014) Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:216.

- APA AAdP (2014) DMS-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Porto Alegre: Artmed.
- APA AdPA (2000) Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais. Washington, DC.
- Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J (2011a) Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, behavior, and immunity* 25:40-45.
- Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J (2011b) Altered T cell responses in children with autism. *Brain, behavior, and immunity* 25:840-849.
- Atladottir HO, Thorsen P, Schendel DE, Ostergaard L, Lemcke S, Parner ET (2010) Association of hospitalization for infection in childhood with diagnosis of autism spectrum disorders: a Danish cohort study. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 164:470-477.
- Azumagawa K, Suzuki S, Tanabe T, Wakamiya E, Kawamura N, Tamai H (2003) Neopterin, biopterin, and nitric oxide concentrations in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system infections. *Brain & development* 25:200-202.
- Baier-Bitterlich G, Fuchs D, Murr C, Reibnegger G, Werner-Felmayer G, Sgonc R, Bock G, Dierich MP, Wachter H (1995) Effect of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on tumor necrosis factor-alpha induced programmed cell death. *FEBS Lett* 364:234-238.
- Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain: a journal of neurology* 121 (Pt 5):889-905.
- Bailey AR, Giunta BN, Obregon D, Nikolic WV, Tian J, Sanberg CD, Sutton DT, Tan J (2008) Peripheral biomarkers in Autism: secreted amyloid precursor protein-alpha as a probable key player in early diagnosis. *International journal of clinical and experimental medicine* 1:338-344.
- Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Schaner P, Taskiran ZE, Richards N, Orhan D, Gucer S, Ozen S, Gumucio D, Yilmaz E (2008) Expression of ASC in renal tissues of familial mediterranean fever patients with amyloidosis: postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition. *Experimental biology and medicine* 233:1324-1333.
- Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway.

- The international journal of biochemistry & cell biology 41:467-471.
- Barja G (1998) Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854:224-238.
- Bauer M, Suppmann S, Meyer M, Hesslinger C, Gasser T, Widmer HR, Ueffing M (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. *Journal of neurochemistry* 82:1300-1310.
- Bechmann I, Nitsch R (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20:145-154.
- Bender DA (1983) Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 6:101-197.
- Berg BM, Godbout JP, Kelley KW, Johnson RW (2004) Alpha-tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain, behavior, and immunity* 18:149-157.
- Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA, DiStefano PS (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* 274:12955-12958.
- Bhattacharyya A, Pathak S, Basak C, Law S, Kundu M, Basu J (2003) Execution of macrophage apoptosis by *Mycobacterium avium* through apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling and caspase 8 activation. *The Journal of biological chemistry* 278:26517-26525.
- Bilbo SD, Biedenkapp JC, Der-Avakian A, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF (2005) Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:8000-8009.
- Blau N, Barnes I, Dhondt JL (1996) International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *Journal of inherited metabolic disease* 19:8-14.
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Molecular cell* 11:529-541.

- Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, Heesemann J, Autenrieth IB (1998) IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *Journal of immunology* 160:299-307.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43:281-291.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepień A (2008) Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neuroscience letters* 441:158-162.
- Broderick L, Hoffman HM (2014) cASCading specks. *Nat Immunol* 15:698-700.
- Brown MS, Singel D, Hepburn S, Rojas DC (2013) Increased glutamate concentration in the auditory cortex of persons with autism and first-degree relatives: a (1) H-MRS study. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 6:1-10.
- Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM (2010) Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *The Journal of experimental medicine* 207:1745-1755.
- Bruey JM, Bruey-Sedano N, Newman R, Chandler S, Stehlik C, Reed JC (2004) PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 279:51897-51907.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 31:149-160.
- Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG (2003) Differential roles of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain research* 975:37-47.
- Calabrese V, Ravagna A, Colombrita C, Scapagnini G, Guagliano E, Calvani M, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM (2005) Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and

- protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *Journal of neuroscience research* 79:509-521.
- Cano OD, Neurauter G, Fuchs D, Shearer GM, Boasso A (2008) Differential effect of type I and type II interferons on neopterin production and amino acid metabolism in human astrocyte-derived cells. *Neuroscience letters* 438:22-25.
- Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI (1989) Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *Journal of leukocyte biology* 45:29-34.
- Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC (2006) CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews* 213:48-65.
- Casal JA, Robles A, Tutor JC (2003) Serum markers of monocyte/macrophage activation in patients with Alzheimer's disease and other types of dementia. *Clinical biochemistry* 36:553-556.
- Casamenti F, Prosperi C, Scali C, Giovannelli L, Colivicchi MA, Fausone-Pellegrini MS, Pepeu G (1999) Interleukin-1 β activates forebrain glial cells and increases nitric oxide production and cortical glutamate and GABA release in vivo: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 91:831-842.
- Case C, Shin S, Roy C (2009) Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 77:1981-1991.
- Chang YP, Ka SM, Hsu WH, Chen A, Chao LK, Lin CC, Hsieh CC, Chen MC, Chiu HW, Ho CL, Chiu YC, Liu ML, Hua KF (2014) Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. *Journal of cellular physiology*.
- Chang YP, Ka SM, Hsu WH, Chen A, Chao LK, Lin CC, Hsieh CC, Chen MC, Chiu HW, Ho CL, Chiu YC, Liu ML, Hua KF (2015) Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. *Journal of cellular physiology* 230:1567-1579.
- Chin MH, Qian WJ, Wang H, Petyuk VA, Bloom JS, Sforza DM, Lacan G, Liu D, Khan AH, Cantor RM, Bigelow DJ, Melega WP, Camp DG, 2nd, Smith RD, Smith DJ (2008) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis revealed by proteomic and transcriptomic analyses of the striata in two

- mouse models of Parkinson's disease. *J Proteome Res* 7:666-677.
- Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU (2014) Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. *PLoS ONE* 9:e92325.
- Chu J, Thomas LM, Watkins SC, Franchi L, Nunez G, Salter RD (2009) Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 β from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. *Journal of leukocyte biology* 86:1227-1238.
- Cirillo P, Pacileo M, de Rosa S, Calabro P, Gargiulo A, Angri V, Granato-Corigliano F, Fiorentino I, Prevete N, De Palma R, Mauro C, Leonardi A, Chiariello M (2006) Neopterin induces pro-atherothrombotic phenotype in human coronary endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4:2248–2255.
- Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, de Bernard M (2013) Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PloS one* 8:e55375.
- Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Nunez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LA (2015) A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine* 21:248-255.
- Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH, Law PA, Peeden JN (1999) Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *Journal of child neurology* 14:388-394.
- Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM (2000) TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer research* 60:6236-6242.
- Couturier J, Stancu IC, Schakman O, Pierrot N, Huaux F, Kienlen-Campard P, Dewachter I, Octave JN (2016) Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease. *Journal of neuroinflammation* 13:20.

- D'Sa C, Hirayama K, West A, Hahn M, Zhu M, Kapatos G (1996) Tetrahydrobiopterin biosynthesis in C6 glioma cells: induction of GTP cyclohydrolase I gene expression by lipopolysaccharide and cytokine treatment. *Brain research Molecular brain research* 41:105-110.
- Dai W, Gupta SL (1990) Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *The Journal of biological chemistry* 265:19871-19877.
- Das T, Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Maquart M, Gasque P (2014) Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against chikungunya neuroinfection. *The Journal of general virology*.
- de Lucas RD, Caputo F, Mendes de Souza K, Sigwalt AR, Ghisoni K, Lock Silveira PC, Remor AP, da Luz Scheffer D, Guglielmo LG, Latini A (2014) Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. *Journal of sports sciences* 32:22-30.
- de Rivero Vaccari JP, Lotocki G, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD, Keane RW (2009) Therapeutic neutralization of the NLRP1 inflammasome reduces the innate immune response and improves histopathology after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29:1251-1261.
- de Rivero Vaccari JP, Lotocki G, Marcillo AE, Dietrich WD, Keane RW (2008) A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:3404-3414.
- DeYoung KL, Ray ME, Su YA, Anzick SL, Johnstone RW, Trapani JA, Meltzer PS, Trent JM (1997) Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene* 15:453-457.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-554.
- Dixon MS, Golstein C, Thomas CM, van Der Biezen EA, Jones JD (2000) Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-

2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:8807-8814.
- Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL, Turner CL, Kivuva E, Maher ER, Smithson SF, Hamilton-Shield JP, Patalan M, Gizewska M, Peregud-Pogorzelski J, Beygo J, Buiting K, Horsthemke B, Soellner L, Begemann M, Eggermann T, Baple E, Mansour S, Temple IK, Mackay DJ (2015) Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans. *Nature communications* 6:8086.
- Dong W, Yang R, Yang J, Yang J, Ding J, Wu H, Zhang J (2015) Resveratrol pretreatment protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury partly via a NALP3 inflammasome pathway. *International journal of clinical and experimental pathology* 8:8731-8741.
- Dostert C, Guarda G, Romero JF, Menu P, Gross O, Tardivel A, Suva ML, Stehle JC, Kopf M, Stamenkovic I, Corradin G, Tschopp J (2009) Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PloS one* 4:e6510.
- Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J (2008) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320:674-677.
- Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357-1361.
- Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, Ting JP (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8041-8046.
- Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, Bergstralh DT, Jarvis GA, Sparling PF, Ting JP (2009) *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *Journal of immunology* 182:6460-6469.
- Enstrom AM, Lit L, Onore CE, Gregg JP, Hansen RL, Pessah IN, Hertz-Picciotto I, Van de Water JA, Sharp FR, Ashwood P (2009) Altered gene expression and function of peripheral blood

- natural killer cells in children with autism. *Brain, behavior, and immunity* 23:124-133.
- Estruch M, Rajamaki K, Sanchez-Quesada JL, Kovanen PT, Oorni K, Benitez S, Ordóñez-Llanos J (2015) Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1 β release in human monocytes and macrophages. *Biochimica et biophysica acta* 1851:1442-1449.
- Eto I, Bandy MD, Butterworth CE, Jr. (1992) Plasma and urinary levels of biopterin, neopterin, and related pterins and plasma levels of folate in infantile autism. *Journal of autism and developmental disorders* 22:295-308.
- Fann DY, Lee SY, Manzanero S, Tang SC, Gelderblom M, Chunduri P, Bernreuther C, Glatzel M, Cheng YL, Thundyil J, Widiapradja A, Lok KZ, Foo SL, Wang YC, Li YI, Drummond GR, Basta M, Magnus T, Jo DG, Mattson MP, Sobey CG, Arumugam TV (2013) Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell death & disease* 4:e790.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Thuras PD (2009) GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *Journal of autism and developmental disorders* 39:223-230.
- Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I, Reed JC (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell* 25:713-724.
- Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri E (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 14:1590-1604.
- Filloux F, Townsend JJ (1993) Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. *Experimental neurology* 119:79-88.
- Fink S, Cookson B (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* 8:1812-1825.
- Fink SL, Bergsbaken T, Cookson, B.T. (2008) Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4312- 4317.

- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine* 198:1043-1055.
- Fombonne E (2009) Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric research* 65:591-598.
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Nunez G (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology* 7:576-582.
- Franchi L, Kanneganti TD, Dubyak GR, Nunez G (2007) Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *The Journal of biological chemistry* 282:18810-18818.
- Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, Mangan MS, Zimmer S, Monks BG, Fricke M, Schmidt RE, Espevik T, Jones B, Jarnicki AG, Hansbro PM, Busto P, Marshak-Rothstein A, Hornemann S, Aguzzi A, Kastentmuller W, Latz E (2014) The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15:727-737.
- Franzini N, Blau N, Walter RB, Schaffner A, Schoedon G (2003) Critical role of interleukin-1beta for transcriptional regulation of endothelial 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23:e50-53.
- Fredrikson S, Link H, Eneroth P (1987) CSF neopterin as marker of disease activity in multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica* 75:352-355.
- Frick B, Schroecksnadel K, Neurauder G, Leblhuber F, Fuchs D (2004) Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age. *Clinical biochemistry* 37:684-687.
- Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, Wang TL (2014) Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PloS one* 9:e106331.
- Fuchs D, Chiodi F, Albert J, Asjo B, Hagberg L, Hausen A, Norkrans G, Reibnegger G, Werner ER, Wachter H (1989a) Neopterin

- concentrations in cerebrospinal fluid and serum of individuals infected with HIV-1. *Aids* 3:285-288.
- Fuchs D, Moller AA, Reibnegger G, Stockle E, Werner ER, Wachter H (1990) Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and with neurologic/psychiatric symptoms. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 3:873-876.
- Fuchs D, Spira TJ, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Felmayer GW, Wachter H (1989b) Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical chemistry* 35:1746-1749.
- Ganong AH, Lanthorn TH, Cotman CW (1983) Kynurenic acid inhibits synaptic and acidic amino acid-induced responses in the rat hippocampus and spinal cord. *Brain research* 273:170-174.
- Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacsikai BJ, Frosch MP (2006) Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of disease* 24:516-524.
- Ghisoni K, da Silva Jr AA, de Oliveira PA, Matheus FC, Gabach L, Perez MF, Carlini VP, Barbeito L, Mongeau R, Lanfumey L, Prediger RD, Latini A (2016) Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. *Brain, behavior, and immunity* In press.
- Ghisoni K, Latini A (2015) Kuehne LK, Reiber H, Bechter K, Hagberg L, Fuchs D., Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research*, Volume 47, Issue 10, October 2013, pages 1417-1422. *Journal of psychiatric research* 63:141-142.
- Ghisoni K, Martins RP, Barbeito L, Latini A (2015) Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. *Journal of psychiatric research* 71:134-139.
- Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW (2005) Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:1329-1331.

- Goines PE, Ashwood P (2013) Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. *Neurotoxicology and teratology* 36:67-81.
- Goldring C, Kitteringham N, Jenkins R, Copple I, Jeannin JF, Park BK (2006) Plasticity in cell defence: access to and reactivity of critical protein residues and DNA response elements. *The Journal of experimental biology* 209:2337-2343.
- Gong Z, Zhou J, Li H, Gao Y, Xu C, Zhao S, Chen Y, Cai W, Wu J (2015) Curcumin suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Molecular nutrition & food research*.
- Gonzalez-Reyes S, Guzman-Beltran S, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J (2013) Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:801418.
- Grossmann V, Schmitt VH, Zeller T, Panova-Noeva M, Schulz A, Laubert-Reh D, Juenger C, Schnabel RB, Abt TG, Laskowski R, Wiltink J, Schulz E, Blankenberg S, Lackner KJ, Munzel T, Wild PS (2015) Profile of the immune and inflammatory response in individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 38:1356-1364.
- Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C, Tschopp J (2011) Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *Journal of immunology* 186:2529-2534.
- Gubandru M, Margina D, Tsitsimpikou C, Goutzourelas N, Tsarouhas K, Ilie M, Tsatsakis AM, Kouretas D (2013) Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 61:209-214.
- Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ (2005) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 49:15-23.
- Guo H, Callaway JB, Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine* 21:677-687.
- Guo H, Petrin D, Zhang Y, Bergeron C, Goodyer CG, LeBlanc AC (2006) Caspase-1 activation of caspase-6 in human apoptotic neurons. *Cell death and differentiation* 13:285-292.

- Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG (2006) Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126:1135-1145.
- Gurung P, Li B, Subbarao Malireddi RK, Lamkanfi M, Geiger TL, Kanneganti TD (2015) Chronic TLR Stimulation Controls NLRP3 Inflammasome Activation through IL-10 Mediated Regulation of NLRP3 Expression and Caspase-8 Activation. *Scientific reports* 5:14488.
- Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA (2013) Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* 341:1250-1253.
- Hagberg L, Dotevall L, Norkrans G, Larsson M, Wachter H, Fuchs D (1993) Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection. *The Journal of infectious diseases* 168:1285-1288.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology* 9:857-865.
- Hanamsagar R, Aldrich A, Kielian T (2014) Critical role for the AIM2 inflammasome during acute CNS bacterial infection. *Journal of neurochemistry* 129:704-711.
- Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V (2014) Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Frontiers in physiology* 5:352.
- Harrison KL, Pheasant AE (1995) Analysis of urinary pterins in autism. *Biochemical Society transactions* 23:603S.
- Hashimoto-Torii K, Kawasaki YI, Kuhn A, Rakic P (2011) Combined transcriptome analysis of fetal human and mouse cerebral cortex exposed to alcohol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:4212-4217.
- Hausen A, Fuchs D, Konig K, Wachter H (1982) Determination of neopterin in human urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 227:61-70.
- He Y, Franchi L, Nunez G (2013a) TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1 β production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *Journal of immunology* 190:334-339.

- He Y, Zhou A, Jiang W (2013b) Toll-like receptor 4-mediated signaling participates in apoptosis of hippocampal neurons. *Neural regeneration research* 8:2744-2753.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493:674-678.
- Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, Bailey MT, Sheridan JF, Godbout JP (2008) Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of neuroinflammation* 5:15.
- Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP (2009) Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, behavior, and immunity* 23:309-317.
- Hoffman HM, Wanderer AA, Broide DH (2001) Familial cold autoinflammatory syndrome: phenotype and genotype of an autosomal dominant periodic fever. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108:615-620.
- Hoffmann G, Rieder J, Smolny M, Seibel M, Wirleitner B, Fuchs D, Schobersberger W (1999) Neopterin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in type II-like alveolar epithelial cells. *Clinical and experimental immunology* 118:435-440.
- Hoffmann G, Schobersberger W, Frede S, Pelzer L, Fandrey J, Wachter H, Fuchs D, Grote J (1996) Neopterin activates transcription factor nuclear factor-kappa B in vascular smooth muscle cells. *FEBS letters* 391:181-184.
- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:8485-8489.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458:514-518.
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E (2008) Silica crystals and aluminum salts

- activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 9:847-856.
- Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI (2004) Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:7895-7902.
- Hsieh HL, Yang CM (2013) Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *BioMed research international* 2013:484613.
- Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathasan S, Humke EW, Eckmann L, Powell JJ, Nizet V, Dixit VM, Karin M (2008) A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 β secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:7803-7808.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H (1984) Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon- γ . *The Journal of experimental medicine* 160:310-316.
- Hull M, Pasinetti GM, Aisen PS (2000) Elevated plasma neopterin levels in Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 14:228-230.
- Hurme M, Seppala IJ (1988) Differential induction of membrane-associated interleukin 1 (IL-1) expression and IL-1 α and IL-1 β secretion by lipopolysaccharide and silica in human monocytes. *Scandinavian journal of immunology* 27:725-730.
- Hytonen J, Kortela E, Waris M, Puustinen J, Salo J, Oksi J (2014) CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 11:103.
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B. *The Journal of biological chemistry* 274:14560-14567.
- Ishii M, Shimizu S, Wajima T, Hagiwara T, Negoro T, Miyazaki A, Tobe T, Kiuchi Y (2005) Reduction of GTP cyclohydrolase I feedback regulating protein expression by hydrogen peroxide in

- vascular endothelial cells. *Journal of pharmacological sciences* 97:299-302.
- Ishino H, Otsuki S (1975) Distribution of Alzheimer's neurofibrillary tangles in the basal ganglia and brain stem of progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Folia psychiatrica et neurologica japonica* 29:179-187.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236:313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M (2003) Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8:379-391.
- Jabaut J, Ather JL, Taracanova A, Poynter ME, Ckless K (2013) Mitochondria-targeted drugs enhance Nlrp3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in association with alterations in cellular redox and energy status. *Free radical biology & medicine* 60:233-245.
- James SJ, Rose S, Melnyk S, Jernigan S, Blossom S, Pavliv O, Gaylor DW (2009) Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:2374-2383.
- Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, Chen VS, Gris D, Matsushima GK, Ting JP (2010) The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:15811-15820.
- Jiang J, Tian K, Diao Y, Chen H, Zhu P, Wang Z (1997) Expression of TNF α , IL-1 β , IL-6 mRNA, release of TNF α in vital organs and their relationship with endotoxin translocation following hemorrhagic shock. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* 12:41-46.
- Jiang L, Saetre P, Radomska KJ, Jazin E, Lindholm Carlstrom E (2010) QKI-7 regulates expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PloS one* 5.

- Jiang Y, Wang M, Huang K, Zhang Z, Shao N, Zhang Y, Wang W, Wang S (2012) Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1 β by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Biochemical and biophysical research communications* 425:121-126.
- Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES (2012) Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry* 287:36617-36622.
- Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, Meng R, Quong AA, Latz E, Scott CP, Alnemri ES (2010) Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *The Journal of biological chemistry* 285:9792-9802.
- Jyonouchi H, Geng L, Davidow AL (2014) Cytokine profiles by peripheral blood monocytes are associated with changes in behavioral symptoms following immune insults in a subset of ASD subjects: an inflammatory subtype? *Journal of neuroinflammation* 11:187.
- Jyonouchi H, Sun S, Le H (2001) Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *Journal of neuroimmunology* 120:170-179.
- Ka SM, Lin JC, Lin TJ, Liu FC, Chao LK, Ho CL, Yeh LT, Sytwu HK, Hua KF, Chen A (2015) Citral alleviates an accelerated and severe lupus nephritis model by inhibiting the activation signal of NLRP3 inflammasome and enhancing Nrf2 activation. *Arthritis research & therapy* 17:331.
- Kajava AV (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *Journal of molecular biology* 277:519-527.
- Kaneko YS, Ikemoto K, Mori K, Nakashima A, Nagatsu I, Ota A (2001) Expression of GTP cyclohydrolase I in murine locus coeruleus is enhanced by peripheral administration of lipopolysaccharide. *Brain research* 890:203-210.
- Kaneko YS, Mori K, Nakashima A, Nagatsu I, Ota A (2003) Peripheral administration of lipopolysaccharide enhances the expression of guanosine triphosphate cyclohydrolase I mRNA in murine locus coeruleus. *Neuroscience* 116:7-12.

- Kaushal V, Dye R, Pakavathkumar P, Foveau B, Flores J, Hyman B, Ghatti B, Koller BH, LeBlanc AC (2015) Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation. *Cell death and differentiation* 22:1676-1686.
- Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM (2011) Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479:117-121.
- Kerler F, Ziegler I, Schwarzkopf B, Bacher A (1989) Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis during lectin stimulation of human peripheral blood lymphocytes. *FEBS letters* 250:622-624.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26:239-257.
- Keystone EC, Wang MM, Layton M, Hollis S, McInnes IB, Team DCS (2012) Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Annals of the rheumatic diseases* 71:1630-1635.
- Khorooshi R, Owens T (2010) Injury-induced type I IFN signaling regulates inflammatory responses in the central nervous system. *Journal of immunology* 185:1258-1264.
- Kojima S, Nomura T, Icho T, Kajiwarra Y, Kitabatake K, Kubota K (1993) Inhibitory effect of neopterin on NADPH-dependent superoxide-generating oxidase of rat peritoneal macrophages. *FEBS letters* 329:125-128.
- Kone-Paut I, Galeotti C (2014) Anakinra for cryopyrin-associated periodic syndrome. *Expert review of clinical immunology* 10:7-18.
- Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Carballo E, Alexopoulou L, Blakeshear PJ, Gaestel M, Davis R, Flavell R, Kollias G (2001) Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *The EMBO journal* 20:3760-3770.
- Krumm N, Turner TN, Baker C, Vives L, Mohajeri K, Witherspoon K, Raja A, Coe BP, Stessman HA, He ZX, Leal SM, Bernier R,

- Eichler EE (2015) Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nature genetics* 47:582-588.
- Kuehne LK, Reiber H, Bechter K, Hagberg L, Fuchs D (2013) Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *Journal of psychiatric research* 47:1417-1422.
- Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, Tschopp J (2007) Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 55:443-452.
- Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P, Gitton X, Widmer A, Patel N, Hawkins PN, Canakinumab in CSG (2009a) Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *The New England journal of medicine* 360:2416-2425.
- Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, Rordorf C, Leslie K, Madhoo S, Wittkowski H, Bek S, Hartmann N, Bosset S, Hawkins PN, Jung T (2009b) In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *The Journal of experimental medicine* 206:1029-1036.
- Lai CF, Ripperger J, Morella KK, Jurlander J, Hawley TS, Carson WE, Kordula T, Caligiuri MA, Hawley RG, Fey GH, Baumann H (1996) Receptors for interleukin (IL)-10 and IL-6-type cytokines use similar signaling mechanisms for inducing transcription through IL-6 response elements. *The Journal of biological chemistry* 271:13968-13975.
- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell death and differentiation* 9:358-361.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD, Van Damme P, Vanden Berghe T, Vanoverberghe I, Vandekerckhove J, Vandenabeele P, Gevaert K, Nunez G (2008) Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7:2350-2363.
- Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM (2009) Glyburide inhibits

- the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *The Journal of cell biology* 187:61-70.
- Lampa J, Westman M, Kadetoff D, Agreus AN, Le Maitre E, Gillis-Haegerstrand C, Andersson M, Khademi M, Corr M, Christianson CA, Delaney A, Yaksh TL, Kosek E, Svensson CI (2012) Peripheral inflammatory disease associated with centrally activated IL-1 system in humans and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:12728-12733.
- Lampert F (1986) Infantile multisystem inflammatory disease: another case of a new syndrome. *European journal of pediatrics* 144:593-596.
- Lazzarini M, Martin S, Mitkovski M, Vozari RR, Stuhmer W, Bel ED (2013) Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. *Glia* 61:1084-1100.
- Lehmann J, Schaefer P, Ferkany JW, Coyle JT (1983) Quinolinic acid evokes [3H]acetylcholine release in striatal slices: mediation by NMDA-type excitatory amino acid receptors. *European journal of pharmacology* 96:111-115.
- Lenzlinger PM, Hans VH, Joller-Jemelka HI, Trentz O, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T (2001) Markers for cell-mediated immune response are elevated in cerebrospinal fluid and serum after severe traumatic brain injury in humans. *Journal of neurotrauma* 18:479-489.
- Leuzzi V, Carducci CA, Carducci CL, Pozzessere S, Burlina A, Cerone R, Concolino D, Donati MA, Fiori L, Meli C, Ponzzone A, Porta F, Strisciuglio P, Antonozzi I, Blau N (2010) Phenotypic variability, neurological outcome and genetics background of 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency. *Clinical genetics* 77:249-257.
- Levine RA, Kapatos G, Kaufman S, Milstien S (1990) Immunological evidence for the requirement of sepiapterin reductase for tetrahydrobiopterin biosynthesis in brain. *Journal of neurochemistry* 54:1218-1224.
- Li H, Zhou X, Zhang J (2014) Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammasome activation in human gingival epithelial cells. *International journal of molecular medicine* 34:1039-1044.
- Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, Ji L, Brown T, Malik M (2009a) Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of neuroimmunology* 207:111-116.

- Li XZ, Bai LM, Yang YP, Luo WF, Hu WD, Chen JP, Mao CJ, Liu CF (2009b) Effects of IL-6 secreted from astrocytes on the survival of dopaminergic neurons in lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neuroscience research* 65:252-258.
- Li Y, Li J, Li S, Li Y, Wang X, Liu B, Fu Q, Ma S (2015) Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK. *Toxicology and applied pharmacology* 286:53-63.
- Liang Y, Jing X, Zeng Z, Bi W, Chen Y, Wu X, Yang L, Liu J, Xiao S, Liu S, Lin D, Tao E (2015) Rifampicin attenuates rotenone-induced inflammation via suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Brain research* 1622:43-50.
- Lim CK, Essa MM, de Paula Martins R, Lovejoy DB, Bilgin AA, Waly MI, Al-Farsi YM, Al-Sharbati M, Al-Shaffae MA, Guillemin GJ (2015) Altered kynurenine pathway metabolism in autism: Implication for immune-induced glutamatergic activity. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*.
- Lim CK, Yap MM, Kent SJ, Gras G, Samah B, Batten JC, De Rose R, Heng B, Brew BJ, Guillemin GJ (2013) Characterization of the kynurenine pathway and quinolinic Acid production in macaque macrophages. *International journal of tryptophan research : IJTR* 6:7-19.
- Lin W, Wu RT, Wu T, Khor TO, Wang H, Kong AN (2008) Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochemical pharmacology* 76:967-973.
- Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA, Szabo G (2013) Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *Journal of leukocyte biology* 94:171-182.
- Liu Z, Zaki MH, Vogel P, Gurung P, Finlay BB, Deng W, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2012) Role of inflammasomes in host defense against *Citrobacter rodentium* infection. *The Journal of biological chemistry* 287:16955-16964.
- Lodge PA, Sriram S (1996) Regulation of microglial activation by TGF- β , IL-10, and CSF-1. *Journal of leukocyte biology* 60:502-508.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275.
- Lu M, Sun XL, Qiao C, Liu Y, Ding JH, Hu G (2014) Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation. *Neurobiology of aging* 35:421-430.
- Luheshi NM, Giles JA, Lopez-Castejon G, Brough D (2012) Sphingosine regulates the NLRP3-inflammasome and IL-1 β release from macrophages. *European journal of immunology* 42:716-725.
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825-835.
- Maes M, Twisk FN, Ringel K (2012) Inflammatory and cell-mediated immune biomarkers in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and depression: inflammatory markers are higher in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome than in depression. *Psychotherapy and psychosomatics* 81:286-295.
- Maggioli E, McArthur S, Mauro C, Kieswich J, Kusters DH, Reutelingsperger CP, Yaqoob M, Solito E (2015) Estrogen protects the blood-brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking. *Brain, behavior, and immunity*.
- Makkonen I, Riikonen R, Kokki H, Airaksinen MM, Kuikka JT (2008) Serotonin and dopamine transporter binding in children with autism determined by SPECT. *Developmental medicine and child neurology* 50:593-597.
- Malyak M, Smith MF, Jr., Abel AA, Hance KR, Arend WP (1998) The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. *Journal of immunology* 161:2004-2010.
- Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M (2007) Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF- κ B in human aortic smooth muscle cells. *Archives of physiology and biochemistry* 113:163-172.
- Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, He Z, Zeng Y, Hu Y, Sun S, Li J, Wu X, Wang X, Strober W, Chen C, Meng G, Sun B (2013) Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome

- activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell research* 23:201-212.
- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213-218.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 10:417-426.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
- Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, Mullooly N, Mielke LA, Harris J, Coll RC, Mills KH, Mok KH, Newsholme P, Nunez G, Yodoi J, Kahn SE, Lavelle EC, O'Neill LA (2010) Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nature immunology* 11:897-904.
- Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry* 274:33835-33838.
- Mauro C, Leow SC, Anso E, Rocha S, Thotakura AK, Tornatore L, Moretti M, De Smaele E, Beg AA, Tergaonkar V, Chandel NS, Franzoso G (2011) NF-kappaB controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. *Nature cell biology* 13:1272-1279.
- Mawhinney LJ, de Rivero Vaccari JP, Dale GA, Keane RW, Bramlett HM (2011) Heightened inflammasome activation is linked to age-related cognitive impairment in Fischer 344 rats. *BMC neuroscience* 12:123.
- Mayer B, John M, Bohme E (1990) Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS letters* 277:215-219.
- McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Aghajanian GK, Heninger GR, Price LH (1996) Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder. *Archives of general psychiatry* 53:993-1000.

- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- Meissner F, Seger RA, Moshous D, Fischer A, Reichenbach J, Zychlinsky A (2010) Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood* 116:1570-1573.
- Melichar B, Kalabova H, Krcmova LK, Trivedi SV, Kralickova P, Malirova E, Pecka M, Studentova H, Zezulova M, Holeckova P, Solichova D (2014) Urinary neopterin concentrations during combination therapy with cetuximab in previously treated patients with metastatic colorectal carcinoma. *In vivo* 28:953-959.
- Meng XF, Tan L, Tan MS, Jiang T, Tan CC, Li MM, Wang HF, Yu JT (2014) Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus. *Journal of neuroinflammation* 11:212.
- Messahel S, Pheasant AE, Pall H, Ahmed-Choudhury J, Sungum-Paliwal RS, Vostanis P (1998) Urinary levels of neopterin and biopterin in autism. *Neuroscience letters* 241:17-20.
- Miao EA, Ernst RK, Dors M, Mao DP, Aderem A (2008) *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:2562-2567.
- Miles JH, Takahashi TN, Bagby S, Sahota PK, Vaslow DF, Wang CH, Hillman RE, Farmer JE (2005) Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. *American journal of medical genetics Part A* 135:171-180.
- Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, Cox GF, Dickinson H, Gentile J, Harris DJ, Hegde V, Hundley R, Khwaja O, Kothare S, Luedke C, Nasir R, Poduri A, Prasad K, Raffalli P, Reinhard A, Smith SE, Sobeih MM, Soul JS, Stoler J, Takeoka M, Tan WH, Thakuria J, Wolff R, Yusupov R, Gusella JF, Daly MJ, Wu BL (2009) Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *Journal of medical genetics* 46:242-248.
- Mills KH (2011) TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature reviews Immunology* 11:807-822.

- Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW (2013) Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 61:1113-1121.
- Mistry P, Reid J, Pouliquen I, McHugh S, Abberley L, DeWall S, Taylor A, Tong X, Rocha Del Cura M, McKie E (2014) Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single-dose antiinterleukin- 18 mAb GSK1070806 in healthy and obese subjects. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 52:867-879.
- Molero-Luis M, Fernandez-Urena S, Jordan I, Serrano M, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Artuch R, Neopterin Working G (2013) Cerebrospinal fluid neopterin analysis in neuropsychiatric patients: establishment of a new cut off-value for the identification of inflammatory-immune mediated processes. *PloS one* 8:e83237.
- Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, Swanson MS (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* 203:1093–1104.
- Mostafa GA, Al-Ayadhi LY (2011) A lack of association between hyperserotonemia and the increased frequency of serum anti-myelin basic protein auto-antibodies in autistic children. *Journal of neuroinflammation* 8:71.
- Muckle TJ, Wellsm (1962) Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *The Quarterly journal of medicine* 31:235-248.
- Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T (2012) Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:11282-11287.
- Nagatsu T, Sawada M, Yamaguchi T, Sugimoto T, Matsuura S, Akino M, Nakazawa N, Ogawa H (1984) Radioimmunoassay for neopterin in body fluids and tissues. *Analytical biochemistry* 141:472-480.
- Nagyoszi P, Nyul-Toth A, Fazakas C, Wilhelm I, Kozma M, Molnar J, Hasko J, Krizbai IA (2015) Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. *Journal of neurochemistry* 135:551-564.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AMK (2011) Autophagy proteins regulate

- innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature Immunology* 12:222–230.
- Napolioni V, Ober-Reynolds B, Szelinger S, Corneveaux JJ, Pawlowski T, Ober-Reynolds S, Kirwan J, Persico AM, Melmed RD, Craig DW, Smith CJ, Huentelman MJ (2013) Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum disorder. *Journal of neuroinflammation* 10:38.
- Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA (2009) Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324–2335.
- Nichol CA, Smith GK, Duch DS (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annual review of biochemistry* 54:729–764.
- Niederwieser A, Curtius HC, Bettoni O, Bieri J, Schircks B, Viscontini M, Schaub J (1979) Atypical phenylketonuria caused by 7, 8-dihydrobiopterin synthetase deficiency. *Lancet* 1:131–133.
- Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, Takagi Y, Sono H, Gon Y, Yodoi J (1999) Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *The Journal of biological chemistry* 274:21645–21650.
- Ogiwara S, Kiuchi K, Nagatsu T, Teradaira R, Nagatsu I, Fujita K, Sugimoto T (1992) Highly sensitive, specific enzyme-linked immunosorbent assay of neopterin and biopterin in biological samples. *Clinical chemistry* 38:1954–1958.
- Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, Cassina P, Barbeito L (2008) Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiology of disease* 32:528–534.
- OMS (2013) Autism spectrum disorders and other developmental disorders: From raising awareness to building capacity. Geneva.
- Opladen T, Hoffmann GF, Blau N (2012) An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with

- hyperphenylalaninaemia. *Journal of inherited metabolic disease* 35:963-973.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13766-13771.
- Palotai M, Kiss E, Bagosi Z, Jaszberenyi M, Toth G, Varadi G, Telegdy G (2014) Interleukin-1beta (187-207)-induced hyperthermia is inhibited by interleukin-1beta (193-195) in rats. *Neurochemical research* 39:254-258.
- Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD (2014) Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1beta-related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. *Brain, behavior, and immunity* 41:90-100.
- Park KW, Lee HG, Jin BK, Lee YB (2007) Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Experimental & molecular medicine* 39:812-819.
- Park S, Juliana C, Hong S, Datta P, Hwang I, Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Alnemri ES (2013) The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. *Journal of immunology* 191:4358-4366.
- Parker DC, Mielke MM, Yu Q, Rosenberg PB, Jain A, Lyketsos CG, Fedarko NS, Oh ES (2013) Plasma neopterin level as a marker of peripheral immune activation in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *International journal of geriatric psychiatry* 28:149-154.
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews* 94:1077-1098.
- Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal* 25:5071-5082.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of biological chemistry* 269:15195-15203.

- Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation* 14:1583-1589.
- Piantadosi CA, Withers CM, Bartz RR, MacGarvey NC, Fu P, Sweeney TE, Welty-Wolf KE, Suliman HB (2011) Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *The Journal of biological chemistry* 286:16374-16385.
- Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A (2008) ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:8067-8072.
- Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandona D, Savaglio E, Di Virgilio F (2007) Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* 109:3856-3864.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular cell* 22:269-275.
- Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2001) Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *The Journal of biological chemistry* 276:28309-28313.
- Presterla T, Talalay P, Alam J, Ahn YI, Lee PJ, Choi AM (1995) Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Molecular medicine* 1:827-837.
- Puntener U, Booth SG, Perry VH, Teeling JL (2012) Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Journal of neuroinflammation* 9:146.
- Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Latini A, Wajner M, Souza DO, Goncalves CA, Gottfried C (2013) Resveratrol protects C6

- astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PloS one* 8:e64372.
- Rafice SA, Chauhan N, Efimov I, Basran J, Raven EL (2009) Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society transactions* 37:408-412.
- Rapin I, Tuchman RF (2008) Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. *Pediatric clinics of North America* 55:1129-1146, viii.
- Redcay E, Courchesne E (2005) When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports. *Biological psychiatry* 58:1-9.
- Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA, Stacey KJ (2009) HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323:1057-1060.
- Rubenstein JL, Merzenich MM (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, brain, and behavior* 2:255-267.
- Rushworth SA, Zaitseva L, Murray MY, Shah NM, Bowles KM, MacEwan DJ (2012) The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF-kappaB and underlies its chemo-resistance. *Blood* 120:5188-5198.
- Rutter M, Bailey A, Bolton P, Le Couteur A (1994) Autism and known medical conditions: myth and substance. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 35:311-322.
- Salvemini D, Mollace V, Pistelli A, Anggard E, Vane J (1992) Cultured astrocytoma cells generate a nitric oxide-like factor from endogenous L-arginine and glyceryl trinitrate: effect of *E. coli* lipopolysaccharide. *British journal of pharmacology* 106:931-936.
- Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:10964-10967.
- Saresella M, Marventano I, Guerini FR, Mancuso R, Ceresa L, Zanzottera M, Rusconi B, Maggioni E, Tinelli C, Clerici M (2009) An autistic endophenotype results in complex immune dysfunction in healthy siblings of autistic children. *Biological psychiatry* 66:978-984.
- Sawada M, Hirata Y, Arai H, Iizuka R, Nagatsu T (1987) Tyrosine hydroxylase, tryptophan hydroxylase, bipterin, and neopterin

- in the brains of normal controls and patients with senile dementia of Alzheimer type. *Journal of neurochemistry* 48:760-764.
- Saxena G, Chen J, Shalev A (2010) Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *The Journal of biological chemistry* 285:3997-4005.
- Schobersberger W, Hoffmann G, Grote J, Wachter H, Fuchs D (1995) Induction of inducible nitric oxide synthase expression by neopterin in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 377:461-464.
- Schobersberger W, Hoffmann G, Hobisch-Hagen P, Bock G, Volkl H, Baier-Bitterlich G, Wirleitner B, Wachter H, Fuchs D (1996) Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2. *FEBS letters* 397:263-268.
- Schoedon G, Troppmair J, Fontana A, Huber C, Curtius HC, Niederwieser A (1987) Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. *European journal of biochemistry / FEBS* 166:303-310.
- Schroder K, Tschopp J (2010a) The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
- Schroecksnadel S, Ledjeff E, Gostner J, Winkler G, Kurz K, Schennach H, Fuchs D (2013) Neopterin suppresses the activity of tryptophan-degrading enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood mononuclear cells. *Pteridines* 24:237-243.
- Schwarcz R, Brush GS, Foster AC, French ED (1984) Seizure activity and lesions after intrahippocampal quinolinic acid injection. *Experimental neurology* 84:1-17.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:3394-3406.
- Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suda S, Suzuki K, Sugihara G, Matsuzaki H, Minabe Y, Sugiyama T, Kawai M, Iyo M, Takei N, Mori N (2006) Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 30:1472-1477.

- Siniscalco D, Sapone A, Giordano C, Cirillo A, de Novellis V, de Magistris L, Rossi F, Fasano A, Maione S, Antonucci N (2012) The expression of caspases is enhanced in peripheral blood mononuclear cells of autism spectrum disorder patients. *Journal of autism and developmental disorders* 42:1403-1410.
- Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM (2004) The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *Journal of immunology* 173:4137-4146.
- Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP (2006) Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α . *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:670-682.
- Sterka D, Jr., Rati DM, Marriott I (2006) Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia* 53:322-330.
- Stone TW (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacological reviews* 45:309-379.
- Suh J, Sinclair E, Peterson J, Lee E, Kyriakides TC, Li FY, Hagberg L, Fuchs D, Price RW, Gisslen M, Spudich S (2014) Progressive increase in central nervous system immune activation in untreated primary HIV-1 infection. *Journal of neuroinflammation* 11:199.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735-738.
- Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kamen Y, Shimmura C, Kawai S, Yoshihara Y, Wakuda T, Takebayashi K, Takagai S, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N (2011) Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS one* 6:e20470.
- Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mim-uro H, Inohara N, Sasakawa C, Nunez G (2007) Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog* 3:e111.

- Sweeten TL, Posey DJ, McDougale CJ (2003) High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *The American journal of psychiatry* 160:1691-1693.
- Takahashi K, Rochford CD, Neumann H (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of experimental medicine* 201:647-657.
- Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O (1986) Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of biological chemistry* 261:3648-3653.
- Tammimies K, Marshall CR, Walker S, Kaur G, Thiruvahindrapuram B, Lionel AC, Yuen RK, Uddin M, Roberts W, Weksberg R, Woodbury-Smith M, Zwaigenbaum L, Anagnostou E, Wang Z, Wei J, Howe JL, Gazzellone MJ, Lau L, Sung WW, Whitten K, Vardy C, Crosbie V, Tsang B, D'Abate L, Tong WW, Luscombe S, Doyle T, Carter MT, Szatmari P, Stuckless S, Merico D, Stavropoulos DJ, Scherer SW, Fernandez BA (2015) Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *Jama* 314:895-903.
- Tan MS, Tan L, Jiang T, Zhu XC, Wang HF, Jia CD, Yu JT (2014) Amyloid-beta induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell death & disease* 5:e1382.
- Terrill-Usery SE, Mohan MJ, Nichols MR (2014) Amyloid-beta(1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1beta despite significant intracellular IL-1beta accumulation in microglia. *Biochimica et biophysica acta* 1842:2276-2285.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
- Tong ZB, Bondy CA, Zhou J, Nelson LM (2002) A human homologue of mouse Mater, a maternal effect gene essential for early embryonic development. *Human reproduction* 17:903-911.
- Tong ZB, Gold L, De Pol A, Vanevski K, Dorward H, Sena P, Palumbo C, Bondy CA, Nelson LM (2004) Developmental expression and subcellular localization of mouse MATER, an oocyte-specific protein essential for early development. *Endocrinology* 145:1427-1434.

- Tronel C, Rochefort GY, Arlicot N, Bodard S, Chalon S, Antier D (2013) Oxidative stress is related to the deleterious effects of heme oxygenase-1 in an in vivo neuroinflammatory rat model. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:264935.
- Troppmair J, Nachbaur K, Herold M, Aulitzky W, Tilg H, Gastl G, Bieling P, Kotlan B, Flener R, Mull B, et al. (1988) In-vitro and in-vivo studies on the induction of neopterin biosynthesis by cytokines, alloantigens and lipopolysaccharide (LPS). *Clinical and experimental immunology* 74:392-397.
- Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Chen HC, Shui HA, Li CY, Hua KF, Chang WL, Huang JJ, Yang SS, Chen A (2011) Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free radical biology & medicine* 51:744-754.
- Turgan N, Habif S, Parildar Z, Ozmen D, Mutaf I, Erdener D, Bayindir O (2001) Association between homocysteine and neopterin in healthy subjects measured by a simple HPLC-fluorometric method. *Clinical biochemistry* 34:271-275.
- Vaissiere C, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I (1999) NADPH oxidase is functionally assembled in specific granules during activation of human neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 65:629-634.
- Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27:693-733.
- van Kooten IA, Palmen SJ, von Cappeln P, Steinbusch HW, Korr H, Heinsen H, Hof PR, van Engeland H, Schmitz C (2008) Neurons in the fusiform gyrus are fewer and smaller in autism. *Brain : a journal of neurology* 131:987-999.
- Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of neurology* 57:67-81.
- Vasconcelos AR, Kinoshita PF, Yshii LM, Marques Orellana AM, Bohmer AE, de Sa Lima L, Alves R, Andreotti DZ, Marcourakis T, Scavone C, Kawamoto EM (2015) Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na,K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Neurobiology of aging* 36:1914-1923.
- Vogt C, Hailer NP, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F (2008) Successful inhibition of excitotoxic neuronal damage and microglial activation after delayed application of interleukin-1

- receptor antagonist. *Journal of neuroscience research* 86:3314-3321.
- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008) Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:8138-8143.
- Walev I, Reske K, Palmer M, Valeva A, Bhakdi S (1995) Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *The EMBO journal* 14:1607-1614.
- Walsh JG, Reinke SN, Mamik MK, McKenzie BA, Maingat F, Branton WG, Broadhurst DI, Power C (2014) Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology* 11:35.
- Wang L, Zhai YQ, Xu LL, Qiao C, Sun XL, Ding JH, Lu M, Hu G (2014) Metabolic inflammation exacerbates dopaminergic neuronal degeneration in response to acute MPTP challenge in type 2 diabetes mice. *Experimental neurology* 251:22-29.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 270:9558-9563.
- Wang Y, Xia H, Yu X, Lu T, Chi X, Cai J (2015) Hemin protects against hippocampal damage following orthotopic autologous liver transplantation in adult rats. *Life sciences* 135:27-34.
- Weber K, Schilling JD (2014) Lysosomes integrate metabolic-inflammatory cross-talk in primary macrophage inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry* 289:9158-9171.
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, de Leon M, Louis LA, Cohen IL, London E, Brown WT, Wisniewski T (2010) The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta neuropathologica* 119:755-770.
- Weiss G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Semenitz E, Dierich MP, Wachter H (1993) Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS letters* 321:89-92.

- Werner ER, Bichler A, Daxenbichler G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Hetzel H, Reibnegger G, Wachter H (1987) Determination of neopterin in serum and urine. *Clinical chemistry* 33:62-66.
- Werner ER, Blau N, Thony B (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *The Biochemical journal* 438:397-414.
- Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Yim JJ, Pflleiderer W, Wachter H (1990) Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. *The Journal of biological chemistry* 265:3189-3192.
- Werner-Felmayer G, Prast H, Werner ER, Philippu A, Wachter H (1993a) Induction of GTP cyclohydrolase I by bacterial lipopolysaccharide in the rat. *FEBS letters* 322:223-226.
- Werner-Felmayer G, Werner ER, Weiss G, Wachter H (1993b) Modulation of nitric oxide synthase activity in intact cells by intracellular tetrahydrobiopterin levels. *Advances in experimental medicine and biology* 338:309-312.
- Widner B, Baier-Bitterlich G, Wede I, Wirleitner B, Fuchs D (1998) Neopterin derivatives modulate the nitration of tyrosine by peroxynitrite. *Biochemical and biophysical research communications* 248:341-346.
- Widner B, Leblhuber F, Fuchs D (2002) Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 109:181-189.
- Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D (2000) Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 107:343-353.
- Wirleitner B, Reider D, Ebner S, Bock G, Widner B, Jaeger M, Schennach H, Romani N, Fuchs D (2002) Monocyte-derived dendritic cells release neopterin. *Journal of leukocyte biology* 72:1148-1153.
- Wissmann P, Geisler S, Leblhuber F, Fuchs D (2013) Immune activation in patients with Alzheimer's disease is associated with high serum phenylalanine concentrations. *Journal of the neurological sciences* 329:29-33.
- Xiong M, Yang Y, Chen GQ, Zhou WH (2009) Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and

- inflammatory cytokine expression. *Brain research bulletin* 79:351-357.
- Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, Sagara J, Guan X, Seki E, Yasuda K, Yamamoto M, Akira S, Nakanishi K, Noda T, Taniguchi S (2004) ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9:1055-1067.
- Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z, Zhou R (2015) Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160:62-73.
- Yang D, Sun YY, Bhaumik SK, Li Y, Baumann JM, Lin X, Zhang Y, Lin SH, Dunn RS, Liu CY, Shie FS, Lee YH, Wills-Karp M, Choungnet CA, Kallapur SG, Lewkowich IP, Lindquist DM, Murali-Krishna K, Kuan CY (2014) Blocking lymphocyte trafficking with FTY720 prevents inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in newborns. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:16467-16481.
- Yoshida Y, Une F, Utatsu Y, Nomoto M, Furukawa Y, Maruyama Y, Machigashira N, Matsuzaki T, Osame M (1999) Adenosine and neopterin levels in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. *Internal medicine* 38:133-139.
- Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, D'Agostino D, Planavsky N, Lupfer C, Kanneganti TD, Kang S, Horvath TL, Fahmy TM, Crawford PA, Biragyn A, Alnemri E, Dixit VD (2015) The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature medicine* 21:263-269.
- Yu M, Li H, Liu Q, Liu F, Tang L, Li C, Yuan Y, Zhan Y, Xu W, Li W, Chen H, Ge C, Wang J, Yang X (2011) Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cellular signalling* 23:883-892.
- Zhang WH, Wang X, Narayanan M, Zhang Y, Huo C, Reed JC, Friedlander RM (2003) Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:16012-16017.
- Zhao C, Gillette DD, Li X, Zhang Z, Wen H (2014) Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2

- inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry* 289:17020-17029.
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J (2010) Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology* 11:136-140.
- Zhu Y, Chen X, Liu Z, Peng YP, Qiu YH (2016) Interleukin-10 Protection against Lipopolysaccharide-Induced Neuro-Inflammation and Neurotoxicity in Ventral Mesencephalic Cultures. *International journal of molecular sciences* 17.
- Zielasek J, Tausch M, Toyka KV, Hartung HP (1992) Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cellular immunology* 141:111-120.
- Zimmerman AW, Jyonouchi H, Comi AM, Connors SL, Milstien S, Varsou A, Heyes MP (2005) Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. *Pediatric neurology* 33:195-201.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.
- Zou J, Crews FT (2012) Inflammasome-IL-1 β Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience* 6:77.